

# Aspergillus属糸状菌における解糖系酵素遺伝子の 選択的プロモーターによる転写制御機構の解析

著者	井上 大志
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00127869">http://hdl.handle.net/10097/00127869</a>

*Aspergillus* 属糸状菌における解糖系酵素遺伝子の選択的プロモーターによる  
転写制御機構の解析

井 上 大 志

## 目次

序論 .....	1
第一章 麹菌 <i>Aspergillus oryzae</i> のエノラーゼ遺伝子の炭素源依存的選択的プロモーターによる転写制御機構の解析	
1-1 緒言 .....	3
1-2 実験材料および方法 .....	4
1-3 結果 .....	19
1-4 考察 .....	26
図表 .....	32
第二章 転写開始点の比較解析から探る <i>Aspergillus</i> 属糸状菌間の解糖系酵素遺伝子群の転写制御における多様性	
2-1 緒言 .....	52
2-2 実験材料および方法 .....	53
2-3 結果 .....	58
2-4 考察 .....	66
図表 .....	72
総括 .....	93
参考文献 .....	94

## 序論

真菌類の子囊菌門に属する *Aspergillus* 属糸状菌には、発酵産業に利用される産業用真菌やヒトの病原菌、穀物のカビ毒汚染原因菌が含まれ、それらは人間社会にも影響を及ぼす(1)。黄麹菌 *Aspergillus oryzae* は、代表的な産業用 *Aspergillus* 属糸状菌の一種であり、米のデンプンや大豆のタンパク質を分解する能力に優れていることから、日本において日本酒や味噌、醤油などの伝統的発酵食品の醸造に古くから利用されている(2)。また、その 1000 年に及ぶ醸造利用の歴史に裏付けられた安全性(3)や高いタンパク質分泌能力(4)、有機酸生産能力(5, 6)から、*A. oryzae* は食品や医薬品用途の有用物質生産宿主としての利用が期待されている。さらに、*A. oryzae* 自身は二次代謝産物をほとんど生産しないため、近年では異種二次代謝産物生産のためのクリーンホストとしての利用も広がりつつある(7, 8)。以上のようにより有用性の高い *A. oryzae* についての理解をさらに深めるため、*A. oryzae* に関する分子生物学的知見の蓄積が進められている。

解糖系は、ほとんどの生物に共通して存在する基本的な代謝系の一つである。その異化経路（解糖）は、10 種類の連続した化学反応によって構成される糖分解経路であり、それに伴う基質レベルのリン酸化によって細胞のエネルギー獲得に寄与する。一方、代謝系の可逆反応を触媒する解糖系酵素群は、2 分子のピルビン酸から 1 分子の糖を合成する同化経路（糖新生）に利用され、核酸や糖鎖などの細胞構成成分合成の出発物質の供給に寄与する。*A. oryzae* では、重要な遺伝子発現プロファイルとして、解糖系酵素遺伝子群がグルコース等の糖存在下において転写レベルで非常に高発現することが知られている(9, 10)。例えば、2-ホスホグリセリン酸とホスホエノールピルビン酸の可逆的な変換反応を触媒するエノラーゼをコードする遺伝子 *enoA* の転写産物量は、*A. oryzae* の代表的な高発現遺伝子である  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 *amyB* に匹敵し、細胞における全 mRNA 量の 3 % (w/w) を占めると推定されている(11)。興味深いことに、世界各地の醸造産業において利用される酵母 *Saccharomyces cerevisiae* でも、糖存在下において解糖系遺伝子群が高発現することが知られる(12)。一般的に、代謝系を構成する酵素遺伝子の発現制御は、特定の環境において数時間から数日にわたり細胞の代謝流量を最適化する上で重要であると考えられる。そのため、上述したような解糖系酵素遺伝子の発現制御について理解することは、発酵産業における微生物の生育制御のための基礎的知見として重要である。また、解糖系酵素遺伝子群のプロモーターは、高発現プロモーターとして生物工学的に利用価値が高い。実際、*A. oryzae* では、有用タンパク質の商業生産に向けた *enoA* プロモーターの改変も試みられている(13)。以上に述べたことから、解糖系酵素遺伝子の発現制御に関わる研究は醸造産業用微生物における遺伝子工学的

ツールの開発という点からも重要である。

*S. cerevisiae* において、解糖系酵素遺伝子群の発現に関与する転写因子は少なくとも 6 つ以上同定されており、それらによる複雑な転写制御機構が提唱されている(14)。一方、*A. oryzae* においては解糖系酵素遺伝子の発現に関与する転写因子が同定されておらず、転写制御機構に関する知見は *S. cerevisiae* と比べて乏しい。本博士論文では、重要な遺伝子発現情報の一つである転写開始点 (Transcription Start Sites: TSSs) に着目した解析を通して、*Aspergillus* 属糸状菌の解糖系酵素遺伝子における転写制御の分子機構の一端を解明することを目的とした。

## 第一章 麹菌 *Aspergillus oryzae* のエノラーゼ遺伝子の炭素源依存的選択的プロモーターによる転写制御機構の解析

### 1-1 緒言

*A. oryzae* の解糖系酵素遺伝子の転写制御機構は、特にエノラーゼ遺伝子 *enoA* における検討が進んでいる。町田らは *enoA* をクローニングする過程で、プライマーエクステンション法により、デキストリン存在下の培養条件における *enoA* の TSS が ATG 上流 17 nt (-17)、-31、-37、-44 付近に位置することを推定した(11)。Toda らは大腸菌由来の GUS 遺伝子 *uidA* を用いた *enoA* プロモーターの deletion 解析を行い、-224 から-121 の 104 bp 領域の欠失がグルコース存在下における *enoA* プロモーターの顕著な活性低下を引き起こすことを示し、さらに全細胞抽出液を用いた Electromobility Shift Assay (EMSA) によって-195 から-181 の 15 bp 領域に何らかのタンパク質が結合する可能性を示した(15)。しかしながら、その後、糖炭素源存在下の *enoA* 高発現に関与する転写因子は現在に至るまで同定されていない。

一方、当研究室の八巻、高間らによるゲノム配列データ(2)と Expressed Sequence Tag (EST) データ(16)の比較や 5' end Serial Analysis of Gene Expression (5' SAGE) データから、*enoA* には-510 と-36 付近に 2 つの異なる TSSs (upstream TSS: uTSS, downstream TSS: dTSS) の存在が認められ (Fig. 1)、それらがグルコースやフルクトース等の発酵性炭素源と酢酸やエタノール等の非発酵性炭素源の違いによって使い分けられることが示唆された。また、当研究室の高間、田路らにより、酢酸培養条件下における uTSS からの *enoA* 発現誘導には、*A. nidulans* において糖新生の不可逆的化学反应を触媒する酵素遺伝子の発現制御に関わると報告された転写因子 AcuK と AcuM (17, 18)のオーソログの関与が指摘されている。

一般的に、環境条件の違いによって使い分けられる複数の TSSs を含むプロモーターは選択的プロモーター (Alternative Promoter: AP) と呼ばれ、真核生物の転写段階における重要な環境応答機構の一つとして知られている(19)。*S. cerevisiae* では、ゲノム中に 2 つのエノラーゼ遺伝子パラログ (*ENO1*、*ENO2*) を有しており、*ENO1* が炭素源の種類によらず構成的に発現する一方で、*ENO2* が糖炭素源存在下でのみ高発現することが知られているが(20)、*A. oryzae* のゲノム中においてエノラーゼをコードする遺伝子は *enoA* 一つのみである(11, 21)。このことから、*A. oryzae* の炭素源の違いに応じたエノラーゼ発現量調節において AP は極めて重要な役割を果たしていることが予想され、*enoA* の AP の存在意義や分子機構を解明することは解糖系酵素遺伝子の発現調節を介した環境適応戦略の理解に繋がると思われる。また、AP の存在は真菌類において複数例報告されているが(22-27)、解糖系のような一次代

謝系に関連する遺伝子における AP の報告例はこれまでにない。そのため、*A. oryzae* の解糖系酵素遺伝子の AP に関する研究は、真菌類における AP の学術的理解の促進という観点からも重要である。本章では、*A. oryzae* の AP による *enoA* 転写制御の意義と分子機構を調べるとともに、*A. oryzae* の解糖系酵素遺伝子群における AP の有無について検討した。

## 1-2 実験材料および方法

### 1-2-1 試薬

試薬類は特に表記のない限り和光純薬（株）の特級試薬を、適宜オートクレーブ処理して用いた。水は、脱塩水または Milli-Q 水（Millipore）を適宜使用した。RNA 実験にあたっては、器具類は 180°C、2 時間で乾熱滅菌した ribonuclease (RNase) フリーのものを使用し、試薬の調製には diethyl pyrocarbonate (DEPC)（ナカライテスク）または dimethyl pyrocarbonate (DMPC)（SIGMA-ALDRICH）で処理した水\*を用いた。

\*DEPC または DMPC 処理により、RNase 活性を除去した Milli-Q 水。Milli-Q 水に DMPC を終濃度が 0.1 % となるように加え、30 分に 1 回程度攪拌しながら 37 °C で 2 時間以上保温した後、2 時間オートクレーブ処理を行って DMPC を除去した。

### 1-2-2 使用菌株

本研究で用いた *A. oryzae* 株は、Table 1 に示した。*A. oryzae* RIB40 株 ((2), National Research Institute of Brewing Stock Culture: NRIB, Higashi-Hiroshima, Japan) は、各種解析において *A. oryzae* の野生株として用いた。 $\beta$ -glucuronidase (GUS) レポーターアッセイに用いる株の構築には、RIB40 株から取得された硝酸還元酵素遺伝子 *niaD* が欠損した *A. oryzae* *niaD*300 株 (28) を形質転換用の親株として用いた。*enoA* プロモーターの GUS レポーターアッセイにおけるポジティブコントロール株は、当研究室の田路によって構築された *enoA* の CDS 上流 1182 bp のプロモーターによる GUS 遺伝子 (*uidA*) 発現コンストラクトを有する *A. oryzae* 株 (田路修論, 2012) を使用した。-121 ~ -224 nt の 103 bp 領域が欠失した *enoA* プロモーターによる *uidA* 発現コンストラクトを有する *A. oryzae* 株は、当研究室の田路によって構築されたものを使用した (田路修論, 2012)。5' UTR 内イントロンの 5' 側または 3' 側のスプライス部位に点変異が導入された *enoA* プロモーターによる *uidA* 発現コンストラクトを有する *A. oryzae* 株は、当研究室の田路によって構築されたものを使用した (田路修論, 2012)。イントロン欠失変異を有する *enoA* プロモーターによる *uidA* 発現コンストラクトを有する *A. oryzae* 株は、当研究室の田路によって構築されたものを使用した (田路修論, 2012)。*acuK* および *acuM* 遺伝子破壊株作製には、*niaD* と ATP スルフリラーゼ遺伝子 (*sC*) が欠損した *A. oryzae*  $\Delta$ *ligD::ptrA* 株 (29) を親株として用いた。遺伝子破壊には *sC* を選択マーカーとして利用し、さらに *niaD* 遺伝子欠損を相補した株を  $\Delta$ *acuK*、 $\Delta$ *acuM* として用いた。また、 $\Delta$ *ligD::sC* 株 (29) の *niaD* 遺

伝子欠損を相補した株を  $\Delta acuK$ 、 $\Delta acuM$  のコントロール株として用いた。各種変異を有する *enoA* プロモーターで染色体上の本来の *enoA* プロモーターを置換した株の構築には、 $\Delta ligD::ptrA$  株の *niaD* 欠損を相補することで取得した  $\Delta ligD::ptrA\_niaD^+$  株を親株として使用した。また、*enoA* プロモーター上流領域に形質転換マーカー *sC* を挿入した株を各種 *enoA* プロモーター置換株のコントロール株として使用した。*A. oryzae* の形質転換に用いるプラスミド DNA の構築および増幅に用いる *Escherichia coli* コンピテントセルの調製には、*E. coli* DH5 $\alpha$  株(30)または *E. coli* SCS110 株 (Stratagene) を使用した。

### 1-2-3 培地

用途に合わせて以下の培地を使用した。寒天プレートを作製する際は、各培地に終濃度 1.5% となるように寒天を加えた。

- YPD 培地; 0.5% yeast extract, 1% peptone, and 1% glucose
- CD 培地; 1-2% carbon source, 0.3% NaNO<sub>3</sub> (*niaD* 欠損株培養時には、窒素源を 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> に置き換えた) , 0.1% KCl, 0.05% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>, trace elements (3.6  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>, 30.7  $\mu$ M ZnSO<sub>4</sub>, 2.5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>, 0.7  $\mu$ M MnSO<sub>4</sub>, 0.3  $\mu$ M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 0.04  $\mu$ M (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 4.68% NaCl (NaCl は形質転換用培地にのみ加えた)
- LB + ampicillin ; 1% Bacto™ tryptone, 0.5% Bacto™ yeast extract, 0.5% NaCl, 0.005% ampicillin

### 1-2-4 分生子懸濁液の調製

分生子懸濁液の作製は以下の手順に従って行った。グルコースを炭素源とした CD プレートに *A. oryzae* RIB40 株を接種し、菌体が生育したプレートに約 10 ml の Tween saline 溶液 (0.8% NaCl, 0.025% Tween 20®) を加え、加熱滅菌した白金耳で菌体を掻き取った。プレート内の分生子を含んだ tween saline 溶液をオートクレーブで滅菌した Miracloth (Merck Millipore) で濾過して菌糸を取り除き、得られた分生子を滅菌水で洗浄して分生子懸濁液とした。分生子数は Thoma 血球計算盤(Sunlead Glass, HIRSCMANN®)を用いて計測した。

### 1-2-5 菌体サンプルの回収

各種条件で培養して得た菌体は、Miracloth による濾過で分離し、脱塩水で洗浄、キムタオルでよく脱水後、素早く液体窒素で凍結させ -80 °C で保存した。

### 1-2-6 Total ribonucleic acid (RNA) の調製

Total RNA の調製は ISOGEN (Nippon Gene) を用いて行った。凍結させた菌体を液体窒素中で破碎した後、破碎した菌体を 1 ml の ISOGEN の入った 1.5 ml チューブに移してよく攪



拌・懸濁し、室温で5分間放置した。その後のRNA精製操作は、添付されたプロトコルに従って行った。精製したtotal RNA サンプルの純度と濃度は、NanoDrop®ND-1000 (NanoDrop Technologies) または NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific)により 260 nm と 280 nm における吸光度を測定することで調べ、O.D. 260 / O.D. 280 が 1.8 以上であることを確認した。

#### 1-2-7 Complementary deoxyribonucleic acid (cDNA) の合成

1-2-6 の方法で調製した total RNA 40 – 50 µg を DNase I (Takara Bio) で処理することで deoxyribonucleic acid (DNA) を除去し、逆転写反応の鋳型とした。逆転写反応は M-MLV 逆転写酵素 (Invitrogen) または Prime script II RTase (Takara Bio) を用いて行い、反応後、RNase H (Invitrogen) で処理した。DNase I 処理および逆転写反応、RNase H 処理は全て添付されたプロトコルに従って行った。

#### 1-2-8 Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

qRT-PCR 実験を行う際のリアルタイム polymerase chain reaction (PCR) は、1-2-7 で合成した cDNA と Fast SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific)、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。反応操作は添付されたプロトコルに従って行った。qRT-PCR 実験に用いたプライマーは Table 2 に示した。

qRT-PCR 実験により、*A. oryzae* の *enoA* における2つの TSS 使用率を評価するため、2つの TSS 由来の転写産物を区別して検出できるプライマーセットを設計し、2種類のプライマーセットから得られる増幅効率が5%以内であることを確認した。これら2種類のプライマーセットから得られる増幅シグナル強度と、*enoA* のコーディング領域 (Coding Sequence: CDS) に設計したプライマーセットから得られる増幅シグナル強度の比率をそれぞれ算出し、2つの TSS 使用率の評価指標とした。以上の qRT-PCR 実験における Ct 値は、threshold line を  $\Delta Rn$  値が 1.0 となるように設定することで算出した。

転写産物量比を算出する場合は、 $\Delta\Delta Ct$  法(31)に従って行った。

#### 1-2-9 Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

RT-PCR 実験は、1-2-7 で合成した cDNA を鋳型とし、Ex-Taq DNA ポリメラーゼ (Takara Bio)を用いて行った。PCR 反応操作は添付されたプロトコルに従った。PCR 産物はアガロースゲルを用いて電気泳動し、アガロースゲルを EtBr 染色液 (1 µg/ml ethidium bromide) に 10–30 分間浸した後、トランスイルミネーターによって検出した。使用したプライマーは Figure legend に記載した。

#### 1-2-10 ノーザンブロット

1-2-6 の方法で調製した total RNA 20 µg, ホルムアミド 10 µl, ホルムアルデヒド 3.5 µl, 10×MOPS buffer\* (pH 7.0) (\*20×MOPS buffer; 0.4 M 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid

(MOPS), 100 mM Sodium Acetate, 20 mM ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA)) 1  $\mu$ l, DMPC 水を混合し合計 20  $\mu$ l とし、65°C で 15 分間インキュベートした。急冷後、10×Loading Dye (TaKaRa) を 2  $\mu$ l 加えフラッシュ後、1% (w/v) ホルムアルデヒド変性ゲル (18% formaldehyde, 1×MOPS buffer, 1.0% agarose) にアプライし、1×MOPS buffer を泳動 buffer として 50 V で泳動した。泳動後のゲルは EtBr-NaOH 染色液 (1  $\mu$ g / ml ethidium bromide, 50 mM NaOH) で 40 分以上染色後、中和・脱色液 (0.2 M Sodium Acetate, pH4.0) にて中和・脱色し、10×SSC\* (\*20×SSC; 3M NaCl, 0.3 M Sodium citrate, pH 7.0) に浸した後、UV を照射し、2 本の ribosomal RNA (rRNA) のバンドを確認した。キャピラリートランスファー装置により 10×SSC を転写 buffer として、ナイロンメンブレン (Hybond-N+, Amersham) へ RNA を転写した後、ナイロンメンブレンに UV を照射することで、RNA がナイロンメンブレンに転写されていることを確認した。ナイロンメンブレンは、80°C で 2 時間処理し、RNA を固定した後、ハイブリダイゼーション buffer (Dig Easy Hyb, Roche) で 50°C、1 時間のプレハイブリダイゼーションを行い、DIG 標識したプローブを 10 分間煮沸、急冷し、10 ng / ml となるように加え、ハイブリダイゼーションを一晩行った。ハイブリダイゼーション後のメンブレンは 2×wash buffer (2×SSC, 0.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS)) で室温、5 分間の洗浄を 2 回を行い、0.1×wash buffer (0.1×SSC, 0.1% SDS) で 68°C、15 分間の洗浄を 2 回行った。次に blocking solution (1% blocking reagent (Roche), 100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, pH 7.5) にて 37°C で 60 分間ブロッキングした。その後 blocking solution を捨て、抗 DIG 抗体を blocking solution で 10000 倍に希釈した反応液を加え、37°C で 30 分間振とうさせた。次に抗体 wash buffer (100 mM maleic acid, 150 mM NaCl, 0.3% (v/v) Tween 20) にて室温で 15 分間、2 回洗浄を行った。検出 buffer (100 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5) に 2 分間メンブレンを浸し、その後検出試薬として CSPD (Roche) を 10,000 倍希釈した検出 buffer に浸し、37°C で 30 分間静置後、ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare) により検出した。DIG 標識したプローブの合成は、PCR DIG Probe Synthesize Kit (Roche) を用いて行い、操作は添付のプロトコルに従った。プローブ合成に用いたプライマーは Table 2 に示した。

#### 1-2-11 Rapid amplification of 5' cDNA ends (5' RACE)

1-2-6 の方法で調製した total RNA 5  $\mu$ g を用い、標的遺伝子における 5' RACE 解析を行った。試薬は RNA Ligase-Mediated 法を採用した Gene Racer™ Kit (Invitrogen) を用いた。操作は添付されたプロトコルに従って行った。本章では、1 つの RNA サンプルに対して 5' 末端 cDNA を 10 ~ 12 クローンずつ取得し、それらを DNA シークエンシング解析することで各条件における標的遺伝子の 5' 末端 mRNA 配列を決定した。5' RACE 解析に用いたプライマーは、Table 2 に示した。

#### 1-2-12 DNA シークエンシング解析による塩基配列の決定

DNA シークエンシングは、ユーロフィンジェノミクス株式会社に解析を外注するか、以下の手順に従って行った。シーケンス反応は ABI PRISM™ Sequence Kit (Perkin-Elmer) を用いて行った。サンプルであるプラスミド DNA 適当量を滅菌水で 100  $\mu$ l にフィルアップし、それに対し PEG 溶液 (20% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 6000, 2.5 M NaCl) を等量加えて 4°C にて一晩静置後、4°C、20,400  $\times g$  で 20 分間遠心し、得られたペレットを 70% エタノールによりリンスした後、10  $\mu$ l の TE 緩衝液に溶解した。これをテンプレートとして滅菌水 10  $\mu$ l、3.2 pmol primer 1  $\mu$ l、テンプレート DNA 1  $\mu$ l、Premix (A, C, G, T-Big Dye Terminator, Tris-HCl, pH 9.0) 4  $\mu$ l、5  $\times$  sequencing buffer 4  $\mu$ l の組成で反応溶液を調製し、PCR に供した。プライマーは 1 サンプルにつき一方向のみをそれぞれを用いた。用いたプライマーは Table 1 に示した。PCR は 95°C 30 秒、55°C 15 秒、60°C 4 分を 1 サイクルとして 25 サイクル行った。反応後の溶液を 1.5 ml チューブに移し替え、3 M 酢酸ナトリウム 2  $\mu$ l、エタノール 50  $\mu$ l を加えて氷中で 10 分間静置した。4°C、20,400  $\times g$  にて 20 分間遠心して得られたペレットを 70% エタノールで洗浄し乾燥させた後、20  $\mu$ l の Hi-Di™ Formamide (Thermo Fisher Scientific) に溶解し沸騰水中で 2 分間加熱した。加熱後、氷中で急冷し、Genetic Analyzer 0.5 ml Sample Tubes (Thermo Fisher Scientific) に移してシーケンス解析を行った。解析は、ABI PRISM™310 Genetic Analyzer (PERKIN-ELMER) で行った。

#### 1-2-13 大腸菌の形質転換およびプラスミド DNA の増幅、回収

大腸菌のコンピテントセル作製および形質転換操作は井上らの方法(32)に従って行った。プラスミド DNA の増幅、回収操作はアルカリ SDS 法によって行った。大腸菌のコロニーを爪楊枝で掻き取り、LB+amp 培地 1~5 ml を入れた 50 ml 遠心チューブに植菌し、37°C で一晩振とう培養した。800  $\times g$  で 15 分間遠心し、沈殿に 200  $\mu$ l の GTE 溶液 (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)) を加えてボルテックスミキサーで攪拌し、1.5 ml チューブに移した。これに 400  $\mu$ l の NaOH-SDS 溶液 (0.2 N NaOH, 1% SDS) を加え混合し氷中で 3 分間放置後、300  $\mu$ l の酢酸カリウム溶液 (3 M potassium acetate, 14.3% acetic acid) を加えて混合し、更に氷中で 15 分間放置した。4°C、20,400  $\times g$  で 10 分間遠心後、上清を回収し、等量のイソプロパノールを加えて 4°C、20,400  $\times g$  で 10 分間遠心した。得られた沈殿を 1 mg/ml の RNase A (Takara Bio)を含む TE 緩衝液 400  $\mu$ l に再懸濁し、37°C で 30 分間反応させ、RNA を除去した。これに対しフェノール/クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈殿によりプラスミドを濃縮した。得られたペレットは TE 緩衝液または滅菌水 20~50  $\mu$ l に溶解した。

#### 1-2-14 形質転換に用いるプラスミド DNA の構築

本章で使用したプラスミドの構築に使用したプライマーとプラスミド DNA は、それぞれ Table 2 と Table 3 に示した。プラスミドの構築の際のライゲーション反応は、Ligation Mix (Takara Bio) によって行い、操作は添付のプロトコルに従った。

-181 ~ -195 nt の 15 bp が欠失した *enoA* プロモーター (PenoAΔ-181 to -195) による *uidA* 発現コンストラクトを含むプラスミド pNPenoAΔ-181 to -195GUS は、以下の手順で構築した。野生型の *enoA* プロモーターによる *uidA* 発現コンストラクトを含むプラスミド pNPenoAGUS (田路修論, 2012) と PenoA\_Fw + PenoAΔ-181to-195\_Rv のプライマーセットを用いた PCR により DNA 断片 1、pNPenoAGUS と PenoAΔ-181to-195\_Fw + uidA\_Rv を用いた PCR により DNA 断片 2 をそれぞれ合成した。その後、DNA 断片 1 と DNA 断片 2、および PenoA\_Fw + uidA\_Rv を用いた fusion PCR により、PenoAΔ-181 to -195 の下流側に *uidA* の CDS 領域を繋げたインサート断片を合成した。インサート断片は *Pst*I と *Xba*I で処理し、*Pst*I/*Xba*I 処理した pNGAG1 に挿入することで、pNPenoAΔ-181 to -195GUS を得た。

-137 ~ -179 nt の 43 bp 領域を欠失した *enoA* プロモーター (PenoAΔ-137 to -179) による *uidA* 発現コンストラクトを含むプラスミド pNPenoAΔ-137 to -179GUS は、以下の手順で構築した。pNPenoAGUS と PenoA\_Fw + PenoAΔ-137to-179\_Rv を用いた PCR により DNA 断片 3、pNPenoAGUS と PenoAΔ-137to-179\_Fw + uidA\_Rv を用いた PCR により DNA 断片 4 をそれぞれ合成した。その後、DNA 断片 3 と DNA 断片 4、および PenoA\_Fw + uidA\_Rv を用いた fusion PCR により、PenoAΔ-137 to -179 の下流側に *uidA* の CDS 領域を繋げたインサート断片を合成した。インサート断片は *Pst*I と *Xba*I で処理し、*Pst*I/*Xba*I 処理した pNGAG1 に挿入することで、pNPenoAΔ-137 to -179GUS を得た。

野生型の *fbaA* プロモーターによる *uidA* 発現コンストラクトを含むプラスミド pNPfbaAGUS は、以下の手順で構築した。*A. oryzae* RIB40 のゲノム DNA と PfbaA\_Fw + PfbaA\_Rv を用いた PCR により DNA 断片 5、pNPenoAGUS と uidA\_Fw + uidA\_Rv を用いた PCR により DNA 断片 6 をそれぞれ合成した。その後、DNA 断片 5 と DNA 断片 6、および PfbaA\_Fw + uidA\_Rv を用いた fusion PCR により、*fbaA* プロモーターの下流側に *uidA* の CDS 領域を繋げたインサート断片を合成した。インサート断片は *Pst*I と *Xba*I で処理し、*Pst*I/*Xba*I 処理した pNGAG1 に挿入することで、pNPfbaAGUS を得た。

各種部位特異的変異が導入された *enoA*/*fbaA* プロモーターによる *uidA* 発現コンストラクトを含むプラスミドは、pNPenoAGUS または pNPfbaAGUS を鋳型とした PCR による部位特異的変異導入 (1-2-15 に詳述) によって作製した。ただし、AcuK/AcuM 結合モチーフにおける Mut2 変異が導入された *enoA* プロモーターによる *uidA* 発現コンストラクトを含むプラスミド pNPenoAK/Mm2GUS は、pNPenoAK/Mm1GUS を鋳型として部位特異的変異を導入することで作製した。同様に、AcuK/AcuM 結合モチーフにおける Mut2 変異が導入された *fbaA* プロモーターによる *uidA* 発現コンストラクトを含むプラスミド pNPfbaAK/Mm2GUS は、pNPfbaAK/Mm1GUS を鋳型として部位特異的変異を導入することにより作製した。

*enoA* の 2 つの TSS に由来する 5' UTR 同士の置換が、遺伝子発現に与える影響を調べるために用いたプラスミドは以下のように作製した。野生型の 5' UTR を有する *enoA* プロモーターによる *uidA* 発現コンストラクトを含むプラスミド pNPenoAWT\_5UTRGUS は、以下の手順で構築した。pNPenoAGUS と PenoAWT\_5UTR\_Fw + PenoAWT\_5UTR\_Rv を用いた

PCRによりDNA断片7、pNPenoAGUSとuidA\_Fw + uidA\_Rvを用いたPCRによりDNA断片8をそれぞれ合成した。その後、DNA断片7とDNA断片8、およびPenoAWT\_5UTR\_Fw + uidA\_Rvを用いたfusion PCRにより、-1~-1000 ntのenoAプロモーターの下流側にuidAのCDS領域を繋げたインサート断片を合成した。インサート断片はPstIとXbaIで処理し、PstI/XbaI処理したpNGAG1に挿入することで、pNPenoAWT\_5UTRGUSを得た。uTSS由来の5' UTRがdTSS由来の5' UTRで置換されたenoAプロモーター（PenoArUp-Down\_5UTR）によるuidA発現コンストラクトを含むプラスミドpNPenoArUp-Down\_5UTRGUSは、以下の手順で構築した。pNPenoAWT\_5UTRGUSとPenoA if\_Fw + PenoArUp-Down\_5UTR\_Rvを用いたPCRによりDNA断片9、pNPenoAGUSとPenoArUp-Down\_5UTR\_Fw + uidA\_Rvを用いたPCRによりDNA断片10をそれぞれ合成した。その後、DNA断片9とDNA断片10、およびPenoA if\_Fw + uidA\_Rvを用いたfusion PCRにより、PenoArUp-Down\_5UTRの下流側にuidAのCDS領域を繋げたインサート断片を合成した。インサート断片は、pNPenoAGUSとpNGAG1-if\_Fw + pNGAG1-if\_Rvのプライマーを用いたPCRによって合成したベクター断片に、In fusion Cloning Kit (Takara Bio USA)を用いて挿入し、pNPenoArUp-Down\_5UTRGUSを得た。dTSS由来の5' UTRがuTSS由来の5' UTRで置換されたenoAプロモーター（PenoArDown-Up\_5UTR）によるuidA発現コンストラクトを含むプラスミドpNPenoArDown-Up\_5UTRGUSは、以下の手順で構築した。pNPenoAWT\_5UTRGUSとPenoA if\_Fw + PenoArDown-Up\_5UTR\_Rvを用いたPCRによりDNA断片11、pNPenoAGUSとPenoArDown-Up\_5UTR\_Fw + uidA\_Rvを用いたPCRによりDNA断片12をそれぞれ合成した。その後、DNA断片11とDNA断片12、およびPenoA if\_Fw + uidA\_Rvを用いたfusion PCRにより、PenoArDown-Up\_5UTRの下流側にuidAのCDS領域を繋げたインサート断片を合成した。インサート断片は、pNPenoAGUSとpNGAG1-if\_Fw + pNGAG1-if\_Rvのプライマーを用いたPCRによって合成したベクター断片に、In fusion Cloning Kit (Takara Bio USA Inc.)を用いて挿入し、pNPenoArDown-Up\_5UTRGUSを得た。クローニング反応の操作は、添付のプロトコルの手順に従った。

niaD300株やΔ*ligD::ptrA*株におけるniaDの3'側のCDS領域の欠失変異を相補するために、niaDのATG下流1609~3876 ntの遺伝子領域を含むプラスミドpUC-niaD(unpublished)を使用した。pUC-niaDは、niaD欠損を相補するためのDNA断片が、SmaI処理されたpUC119 (Takara Bio)に挿入されて作製されている。

#### 1-2-15 PCRによるプラスミドDNAへの部位特異的変異導入

変異を導入するプラスミドと変異部位の両端に15~25 baseの隣接領域を有する相補的なプライマーを用いたPCRを行い、PCR産物をDpnIで1~3時間処理した後、残存した新規合成プラスミドを大腸菌に形質転換して増幅、回収することで、部位特異的変異導入プラス

ミドを調製した。得られたプラスミドは全て DNA シークエンシング解析に供し、目的の変異が導入されていること、および予期せぬ変異が実験上重要な領域に導入されていないことを確認した。PCR 反応には、Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (NEB)、KOD FX neo (TOYOBO)、KOD One<sup>®</sup> Master Mix (TOYOBO) のいずれかを用いた。操作はそれぞれの製造元のプロトコルに従った。各種部位特異的変異の導入に用いたプライマーは Table 2 に示した。

#### 1-2-16 遺伝子破壊に用いる DNA 断片の構築

*A. oryzae* の *acuK* および *acuM* 遺伝子破壊に用いる DNA 断片の構築は、以下の手順によって構築した。まず、*Aspergillus nidulans* 由来の *sC* 遺伝子の発現コンストラクトを含む DNA 断片を、プラスミド pUSC (33) と AnsC\_Fw+AnsC\_Rv のプライマーを用いた PCR によって合成した。また、*acuK* CDS 上流領域の DNA 断片と *acuK* CDS 内部の領域の DNA 断片を、RIB40 株のゲノム DNA と up-*acuK*\_Fw + up-*acuK*\_Rv、CDS-*acuK*\_Fw + CDS-*acuK*\_Rv のプライマーを用いた PCR によってそれぞれ合成した。これら 2 つの DNA 断片と *sC* 断片を混合し、up-*acuK*\_Fw + CDS-*acuK*\_Rv のプライマーによる second PCR を行うことで *acuK* 破壊用断片を構築した。一方、*acuM* CDS の上流および下流領域の DNA 断片を RIB40 株のゲノム DNA と up-*acuM*\_Fw + up-*acuM*\_Rv、down-*acuM*\_Fw + down-*acuM*\_Rv のプライマーを用いた PCR によってそれぞれ合成した。これら 2 つの DNA 断片と *sC* 断片を混合し、up-*acuM*\_Fw + down-*acuM*\_Rv のプライマーによる second PCR を行うことで *acuM* 破壊用断片を構築した。

#### 1-2-17 *enoA* プロモーター置換に用いる DNA 断片の構築

*A. oryzae* の *enoA* プロモーターの置換に用いる DNA 断片は、In fusion HD Cloning Kit によって複数の DNA 断片の連結とクローニングを同時に行う方法（マルチクローニング）を利用して構築した。

野生型の *enoA* プロモーターを含む置換用 DNA 断片は、以下の手順で調製した。*A. oryzae* RIB40 のゲノム DNA と up-PenoA-if\_Fw + up-PenoA-if\_Rv を用いた PCR により *enoA* プロモーターの上流領域の DNA 断片、*A. oryzae* RIB40 のゲノム DNA と PenoAif\_Fw2 + PenoAif\_Rv のプライマーを用いた PCR により *enoA* プロモーター (-1 ~ -1000 nt) の DNA 断片をそれぞれ合成した。以上の 2 断片と 1-2-16 の方法で合成した *sC* 断片を、キット添付の直鎖状 pUC19 ベクターに同時に挿入することで pCPeR を得た。その後、pCPeR と up-PenoA-if\_Fw + PenoAif\_Rv2 のプライマーを用いた PCR によって合成した DNA 断片を形質

転換に用いた。

5' スプライス部位における点変異 (5' ssm) が導入された *enoA* プロモーターを含む置換 DNA 断片は、1-2-15 の方法によって pCpEr に 5' ssm が導入して得た pCpE5ssmR と up-PenoA-if\_Fw + PenoAif\_Rv2 のプライマーを用いた PCR を行うことによって合成した。5' ssm 変異導入に用いたプライマーは Table2 に示した。

CE\_2 における mCS3 変異が導入された *enoA* プロモーターを含む置換 DNA 断片は、以下の手順で調製した。sC 断片と、上述した方法で合成した *enoA* プロモーター上流領域断片に加え、pNPenoAmCS3GUS と PenoAif\_Fw2 + PenoAif\_Rv2 を用いた PCR で合成した DNA 断片および RIB40 株のゲノム DNA と CDS-*enoA*-if\_Fw + CDS-*enoA*-if\_Rv のプライマーを用いた PCR で合成した DNA 断片の計 4 断片を直鎖状 pUC19 ベクターに同時に挿入することで pCPemCS3R を得た。そして、pCPemCS3R と up-PenoA-if\_Fw + CDS-*enoA*-if\_Rv のプライマーを用いた PCR によって合成した DNA 断片を、形質転換に用いた。

#### 1-2-18 *A. oryzae* の形質転換

*A. oryzae* の形質転換は、五味らの方法(34)に従って行った。ただし、染色体上の *enoA* プロモーターに mCS3 変異を含む *A. oryzae* 形質転換株のスクリーニングは、選択培地の炭素源を 1%グルコースから 1%酢酸ナトリウムに置き換えて行った。

*A. oryzae* は、1 つの細胞や分生子中に複数の核を有する多核の形態を示す。そのため、目的の変異が導入された核と非変異導入核が混在する株 (ヘテロカリオン) が取得される可能性がある。ヘテロカリオンでは正確な実験結果を得ることができないため、全ての核に変異が導入された株 (ホモカリオン) を取得する操作として、滅菌された爪楊枝による植継を選択培地で 2~4 回繰り返した。

染色体上の *enoA* プロモーターを置換した形質転換体の候補株については、分生子 PCR で得られた PCR 増幅産物を DNA シークエンス解析に供し、予期せぬ変異が導入されていないことおよび *enoA* プロモーター上に目的の変異が導入されていることを確認した。分生子 PCR には KOD One<sup>®</sup> Master Mix (TOYOBO) を使用し、操作は製造元のプロトコルに従った。

#### 1-2-19 サザンブロット解析

*A. oryzae* 株における遺伝子発現コンストラクトの挿入、遺伝子破壊、プロモーター置換はサザンブロットにより確認した (データ省略)。ゲノム DNA の調製とサザンブロットの操

作は、田中らが記載した方法(35)に従って行った。*uidA* 発現コンストラクトを含む形質転換株のゲノム DNA は *Pst*I で処理し、RIB40 株のゲノム DNA と *niaD*-probe\_Fw + *niaD*-probe\_Rv のプライマーを用いた PCR によって調製した検出プローブによって解析し、*uidA* 発現コンストラクトが 1 コピーで含まれていることを確認した。*acuK* または *acuM* 破壊株のゲノム DNA は *Xba*I または *Pst*I でそれぞれ処理し、RIB40 株のゲノム DNA と *acuK*-probe\_Fw + *acuK*-probe\_Rv または *acuM*-probe\_Fw + *acuM*-probe\_Rv のプライマーを用いた PCR によって調製した検出用プローブによって解析し、全ての核に変異が導入されている株(ホモカリオン)であることを確認した。*enoA* プロモーター置換株のゲノム DNA は *Eco*RI で処理し、RIB40 株のゲノム DNA と *enoA*-CDS\_Fw + CDS-*enoA*-if\_Rv のプライマーを用いた PCR によって調製した検出用プローブによって解析し、ホモカリオンであることを確認した。

#### 1-2-20 β-グルクロニダーゼ (GUS) レポーター解析

プロモーター活性を評価するための GUS 活性測定は、Jefferson らの方法(36)を参考に以下の手順に従って行った。液体窒素で凍結破砕した菌体を、800 μl の GUS Lysis buffer (10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 10 mM 2-ME, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0) に懸濁し、1 分間ボルテックス後、氷上に 30 分間静置した。その後、4°C、20,400 × g で 15 分間の遠心処理を 2 回行い、回収した上清を粗酵素液とした。反応系は、752 μl の GUS Reaction buffer (0.2% Triton X-100, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0) と 40 μl の基質 (100 mM *p*-Nitrophenyl-β-D-glucuronide) を混合したものを用意し、予め 37°C に温めておいた。GUS Lysis buffer で適当に希釈した粗酵素液 8 μl を加え、正確に 20 分間、37°C にて反応させ、反応停止液 (1N NaOH) を 320 μl 加えて反応を停止させた。停止後の反応溶液は、415 nm の吸光度を測定した。吸光度の測定には、Ultrospec® 2000 (GE Healthcare) を使用した。粗酵素液のタンパク質濃度は、Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) とマイクロプレートフォトメーター Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific) を用いた Bradford 法(37)によって定量、算出した。Bradford 法の操作は添付のプロトコルに従った。

#### 1-2-21 MEME 解析によるコンセンサスモチーフの探索

*A. oryzae*、*Aspergillus nidulans*、*Aspergillus niger*、*Aspergillus fumigatus* のエノラーゼ遺伝子上流 1000 bp のゲノム配列領域を Aspergillus Genome Database ((38)、<http://www.aspgd.org/>) から取得してエノラーゼ遺伝子プロモーター配列のデータセットとした。以上のデータセットと MEME Suite Software Web サーバー (<http://meme-suite.org/tools/meme>) を用いて、MEME



アルゴリズム(39)によるコンセンサスモチーフ検索を行った。本解析では、E 値が 0.05 以下の検出モチーフを統計的に有意なモチーフとして扱った。

**Table 1. *A. oryzae* strain used in the chapter 1**

Strain (Genotype)	Reference
RIB40	Machida et al., 2005
<i>niaD</i> 300 ( <i>niaD</i> <sup>-</sup> )	Minetoki et al., 1996
<i>Peno</i> AWT_ <i>uidA</i>	田路修論, 2012
<i>Peno</i> AKMm1_ <i>uidA</i>	This study
<i>Peno</i> AKMm2_ <i>uidA</i>	This study
<i>Peno</i> Δ(-224to-121)_ <i>uidA</i>	田路修論, 2012
<i>Peno</i> Δ(-181to-195)_ <i>uidA</i>	This study
<i>Peno</i> Δ(-137to-179)_ <i>uidA</i>	This study
<i>Peno</i> AmCS1_ <i>uidA</i>	This study
<i>Peno</i> AmCS2_ <i>uidA</i>	This study
<i>Peno</i> AmCS3_ <i>uidA</i>	This study
<i>Peno</i> AmCS4_ <i>uidA</i>	This study
<i>Peno</i> AmCS5_ <i>uidA</i>	This study
<i>Peno</i> AmCS6_ <i>uidA</i>	This study
<i>Peno</i> A5ssm_ <i>uidA</i>	田路修論, 2012
<i>Peno</i> A3ssm_ <i>uidA</i>	田路修論, 2012
<i>Peno</i> Δ <i>i</i> _ <i>uidA</i>	田路修論, 2012
Δ <i>ligD</i> :: <i>ptrA</i> ( <i>niaD</i> <sup>-</sup> , <i>sC</i> <sup>-</sup> )	Mizutani et al., 2008
Δ <i>ligD</i> :: <i>sC</i> ( <i>niaD</i> <sup>-</sup> )	Mizutani et al., 2008
Δ <i>ligD</i> :: <i>sC</i> _ <i>niaD</i> <sup>+</sup>	This study
Δ <i>acuK</i>	This study
Δ <i>acuM</i>	This study
Δ <i>ligD</i> :: <i>ptrA</i> _ <i>niaD</i> <sup>+</sup> ( <i>sC</i> <sup>-</sup> )	This study
<i>Peno</i> AWT_rep.	This study
<i>Peno</i> A5ssm_rep	This study
<i>Peno</i> AmCS3_rep	This study
<i>Pfba</i> AWT_ <i>uidA</i>	This study
<i>Pfba</i> AKMm1_ <i>uidA</i>	This study
<i>Pfba</i> AKMm2_ <i>uidA</i>	This study
<i>Pfba</i> AKMm3_ <i>uidA</i>	This study

<i>PfbaAmCE2_uidA</i>	This study
-----------------------	------------

**Table 2. Primers used in the chapter 1**

Primer	Sequence (5' → 3')	Usage
Oligo dT primer	TTTTTTTTTTTTTTTTT	cDNA synthesis
enoA-Up_Fw	AGTCTACTAGTAAGTCTGTCTTATCGTCATCTC	qRT-PCR
enoA-Up_Rv	CGCGGGAGTCGTAAACAGA	
enoA-Down_Fw	CAAGTTAGTCGACTGACCAATTCC	
enoA-Down_Rv	CCGCGGGAGTCGTAAACA	
enoA-CDS_Fw	TCCACGCCCCGCTCTGTTTAC	
enoA-CDS_Rv	GCAAACAGTCTCGGTGACA	
histoneH4_Fw	CAAGCGTATCTCTGCCATGA	
histoneH4_Rv	CACCGAAACCGTAGAGGGTA	
pckA_Fw	AGCGTTGCCCTCTCAAGTACAC	
pckA_Rv	CAACTCGCCGCTGTGGAT	
fbpA_Fw	GCTGCGTATTTGTACGAATGC	
fbpA_Rv	CCACCGGCGTTTTCAAAC	
uidA-Up/Down_Rv	TGGGGTTTCTACAGGACGTAACAT	
uidA-CDS_Fw	ATGTTACGTCCTGTAGAAACCCCA	
uidA-CDS_Rv	TTCCACAGTTTTCGCGATCCA	
gpdA-Up_Fw	ATACTCACCAGTCAATCACCTTATC	
gpdA-Down_Fw	CCACACAGATTGACTGACAGCTAC	
gpdA-Up/Down_Rv	TGGGGGTAGCCATTGTTTAGAT	
gpdA-CDS_Fw	ACACATCTAAACAATGGCTACCCCCAA	
gpdA-CDS_Rv	GATACGGCCAATACGACCGAAG	
enoA-NP_Fw	TCCACGCCCCGCTCTGTTTAC	Probe for northern blot
enoA-NP_Rv	GGTTGACAGAAGTGCGGAAC	
uidA-NP_Fw	CGTCCTGTAGAAACCCCAACC	
uidA-NP_Rv	TTGTTTGCCTCCCTGCTGCG	
fbaA_GSP1	GCGGCAATGGAGAAGTAAGGGCTGATGG	5' RACE
fbaA_GSP2	ACCGTAGGCGGGAGCAAGGCTACGGATG	
pycA_GSP1	TCGGCCTGGTCACGGACCACACGCATAC	
pycA_GSP2	CGGCGTTCTCAACCTTGCGGGCGAAGTC	
pgmA_GSP1	CGGAGACCAGGCCAGGAGATGAAGACG	

pgmA_GSP2	ATTGCCTTCCTTGGCACGCTTGAAGGA	
tpiA_GSP1	GATGACACGGCGCTCGCTGTGTCCAATG	
tpiA_GSP2	CAGGGGATCTTGGCATCCTGCAGCTGAG	
pgkA_GSP1	ACAGGCTTCAGGCTGTACTTGGGATTGG	
pgkA_GSP2	CGGGACGGCCGAGGTGGGACATGAG	
pkiA_GSP1	GCCGGGCAGGTAAACACCCTTGCGAGAG	
pkiA_GSP2	GACACTTGACGCGCAGGGTCTTGTCGTC	
pgiA_GSP1	TGGAGACATTGCGGAGAGCAGCGTGGT	
pgiA_GSP2	GGCCTCCTTGGCCAGCTTGACCAGAAG	
fbpA_GSP1	GACGAGTTGGGCGGAGGCACCGTACATG	
fbpA_GSP2	GGACCCAGGACGGAGTCGGGCAGCTTG	
pckA_GSP1	TCAGGACGTTGTGCTTGACGGGCATCTC	
pckA_GSP2	ATGGCGACGGAGGTAGCAGAGGTCATAC	
pfkA_GSP1	CCAGCCAGCCACAATGGCGTCCCATGAC	
pfkA_GSP2	GCCCGTCTTGACCAGCTCTCCAGCAAG	
PenoA_Fw	AAACTGCAGATGCCTGAATGATGTTGCGCAGTA	Plasmids constructio n
PenoAΔ-181to-195_Rv	TGGATCTAGCAGCGGGGGTTGTGTTC	
PenoAΔ-181to-195_Fw	CAACCCCGCTGCTAGATCCAGAATTGTTTTGATTTCCATTCCCTT	
uidA_Rv	GTATGTGGGTCTAGGCTATCCTGTTAC	
PenoAΔ-137to-179_Rv	TGGAAGGAGACCGGATGGTTCAGTCACGGAGTAC	
PenoAΔ-137to-179_Fw	GAACCATCCGGTCTCCTTCCAACACCGATCCAG	
PfbaA_Fw	TTTTCTGCAGTCAGCTGAGCAGGGACAAGA	
PfbaA_Rv	GGGGTTTCTACAGGACGTAACATTGTGATAGTTGAAAGATTGATCAGA	
uidA_Fw	TTACGTCCTGTAGAAACCCCAACC	
PenoAWT_5UTR_Fw	CTAGCTGCAGCGGACAAGGGAATAACTTCCAATGG	
PenoAWT_5UTR_Rv	GGGGTTTCTACAGGACGTACATTTTGACGAGCTGCGGAATTGG	
PenoA-if_Fw	CGGACAAGGGAATAACTTCCAATG	
PenoArDown-Up_5UTR_Rv	AGTCGTCGTTGGAGGACGGAAGAAAAGAGACGGAAGGGAGGAGAG	
PenoArDown-	TCCGTCCTCCAACGACGACTGTCTCATTACTAGTCTAC	

Up_5UTR_Fw		Introducing mutagenesis
PenoArUp-Down_5UTR_Rv	CAGTGGAACAAAACAACCAAACTCACCTGCGGAATTGGTCA GTCGAC	
PenoArUp-Down_5UTR_Fw	GTGAGTTTGGTTGTTTTGTTTCCACTG	
pNGAG1-if_Fw	CCTAGACCCACATACTATCTGTATACAACTC	
pNGAG1-if_Rv	TTATTCCCTTGTCGCTGCAG	
PenoAK/Mm1_Fw	CAAGCATTAATTTACAAGCTTTACCCCGAGGG	
PenoAK/Mm1_Rv	CCCTCGGGGTAAAGCTTGTAATTAATGCTTG	
PenoAK/Mm2_Fw	ACAAGCTTTACCTTAAGGGAATGCGGAAG	
PenoAK/Mm2_Rv	CTTCCGCATTCCCTTAAGGTAAAGCTTGT	
PenoAmCS1_Fw	CTGAACCATCCGAGGCTAATTTTTGGGTCGTC	
PenoAmCS1_Rv	GACGACCCAAAAATTAGCCTCGGATGGTTCAG	
PenoAmCS2_Fw	CATCCGATCATTCTAGACTTCTCGTCGGTGAACACAAC	
PenoAmCS2_Rv	GTTGTGTTACCGACGAGAAGTCTAGAATGATCGGATG	
PenoAmCS3_Fw	CATTCTTTTTGGGTCGTGAATGAACACAACC	
PenoAmCS3_Rv	GGTTGTGTTCAATTCACGACCCAAAAAGAATG	
PenoAmCS4_Fw	TTGGGTCGTCGGGACACACAACCCCGCTGCTAG	
PenoAmCS4_Rv	CTAGCAGCGGGGGTTGTGTGTCCCGACGACCCAA	
PenoAmCS5_Fw	TGAACACAACCCAACCTGCTAGTCTCC	
PenoAmCS5_Rv	GGAGACTAGCAGGTTGGGTTGTGTTCA	
PfbaAK/Mm1_Fw	ATGGCGGGGATTTTCTTGAGGCGCCTGGGT	
PfbaAK/Mm1_Rv	ACCCAGGCGCCTCAAGAAAATCCCCGCCAT	
PfbaAK/Mm2_Fw	GATGTCATGTGATGGAATGGATTTTCTTGAGGCG	
PfbaAK/Mm2_Rv	CGCCTCAAGAAAATCCATTCCATCACATGACATC	
PfbaAK/Mm3_Fw	GATGTCATGTGATGGAATGGATTTTGGGAGGCG	
PfbaAK/Mm3_Rv	CGCCTCCCGAAAATCCATTCCATCACATGACATC	
PenoAmCE2_Fw	GTTCCCCACTACCATGTGAGTTCTTTCGAGTG	Gene disruption
PenoAmCE2_Rv	CACTCGAAAGAACTCACATGGTAGTGGGGAAC	
PenoA5'ssm_Fw	ATCGTCATCTCCCATAGCTGAGTTTGTTGTTTTG	
PenoA5'ssm_Rv	CAAAACAACCAAACTCAGCTATGGGAGATGACGAT	
AnsC_Fw	AAATCCAAATATGGCTCCTCGTTCCG	
AnsC_Rv	GCTTCTCTTGGAATAGCTGCCCCG	Gene disruption
up-acuK_Fw	GACTCAAGCAGGGAAACACGC	
up-acuK_Rv	CGAACGAGGAGCCATATTTGGATTGCGTTCTATTGCGCGGTG	

CDS-acuK_Fw	CGGGCAGCTATTGCCAAGAGAAGCCACGATGCGGAGTAACTT GCC	
CDS-acuK_Rv	TGTGGCGAAAAGCGTCGTTG	
up-acuM_Fw	GCTGAAAGCCAGCCTATCATTAG	
up-acuM_Rv	CGAACGAGGAGCCATATTTGGATTTTGATCACTGGGCGCAAAA GC	
down-acuM_Fw	CGGGCAGCTATTGCCAAGAGAAGCGCTATCGGCGTCAGGTTT TGG	
up-PenoA-if_Fw	CGGTACCCGGGGATCCACTTCTCGTAACTCTCGGATTG	Promoter replaceme nt
up-PenoA-if_Rv	GCCATATTTGGATTTGATACCCTAGATTTGATTTTCGCTCTG	
PenoA-if_Fw2	ATTGCCAAGAGAAGCCGGACAAGGGAATAACTTCCAATG	
PenoA-if_Rv	CGACTCTAGAGGATCTTTGACGAGCTGCGGAATTG	
PenoA-if_Rv2	TTTGACGAGCTGCGGAATTG	
CDS-enoA-if_Fw	CCGCAGCTCGTCAAAATGC	
CDS-enoA-if_Rv	CGACTCTAGAGGATCGCTGTGCGGGTTCTTGAAG	
niaD-probe_Fw	GCTTATTGTGACCTTTCTCC	Southern blot
niaD-probe_Rv	ATTGTTTTGCTCTTTGCGTC	
acuK-probe_Fw	GCGACTCTTTACCTGCTCGT	
acuK-probe_Rv	GGTGACATGAAATATCGAAGGCAAG	
acuM-probe_Fw	GCTGAAAGCCAGCCTATCATTAG	
acuM-probe_Rv	CGAACGAGGAGCCATATTTGGATTTTGATCACTGGGCGCAAAA GC	

**Table 3. Plasmid DNAs used in the chapter 1**

Plasmid	Reference	Usage
pNGAG1	Fujioka et al., 2007	Construction of pNPenoAGUS
pNPenoAGUS	田路修論, 2012	GUS reporter assay
pNPenoAΔ-121to-224GUS	田路修論, 2012	GUS reporter assay
pNPenoAΔ-181to-195GUS	This study	GUS reporter assay
pNPenoAΔ-137to-179GUS	This study	GUS reporter assay
pNPenoAWT_5UTRGUS	This study	GUS reporter assay
pNPenoArDown-Up_5UTRGUS	This study	GUS reporter assay
pNPenoArUp-Down_5UTRGUS	This study	GUS reporter assay
pUC-niaD	This study	Complementation of <i>niaD</i>

pNPenoAK/Mm1GUS	This study	GUS reporter assay
pNPenoAK/Mm2GUS	This study	GUS reporter assay
pNPenoAmCS1GUS	This study	GUS reporter assay
pNPenoAmCS2GUS	This study	GUS reporter assay
pNPenoAmCS3GUS	This study	GUS reporter assay
pNPenoAmCS4GUS	This study	GUS reporter assay
pNPenoAmCS5GUS	This study	GUS reporter assay
pCPeR	This study	Promoter replacement
pCPe5ssmR	This study	Promoter replacement
pCPemCS3R	This study	Promoter replacement
pUSC	Yamada et al., 1997	Gene disruption
pNPfbaAGUS	This study	GUS reporter assay
pNPfbaAK/Mm1GUS	This study	GUS reporter assay
pNPfbaAK/Mm2GUS	This study	GUS reporter assay
pNPfbaAK/Mm3GUS	This study	GUS reporter assay
pNPfbaAmCE2GUS	This study	GUS reporter assay

### 1-3 結果

#### 1-3-1 *enoA* の AP は炭素源の違いに応答した転写産物量制御に関与する

遺伝子発現制御における一般的な AP の機能としては、①環境変化に応答して異なる TSSs が使用されることによる転写のタイミングと量の制御、②コードされるタンパク質の一次構造における多様性の創出、③5′ 非翻訳領域 (Untranslated Region: UTR) の多様性創出とそれに基づく翻訳制御、の 3 つが指摘されている(19, 40-42)。 *A. oryzae* の *enoA* においては、AP 内の 2 つの TSSs に由来する転写産物間でコード領域の配列に違いが認められないため (Fig. 1B)、②の機能は考えられない。また、*enoA* の AP における③の機能を検討するため、大腸菌由来の GUS 遺伝子 *uidA* を用いたレポーターアッセイにより 2 つの TSSs に由来するそれぞれの 5′ UTR 配列を相互に置換した *enoA* プロモーターの活性を評価したが、野生型と比較して有意な活性変化は認められなかった (Fig. 2)。したがって、*enoA* の AP においては①の機能のみが重要であると考えられた。

既に、八巻、高間らによって行われた 2 つの TSSs 由来の *enoA* 転写産物を区別できるように設計したプライマー (Fig. 3A、赤矢印) を用いた qRT-PCR 解析により、*enoA* の AP における 2 つの TSS の選択は炭素源の違いに依存することが示唆されている (データ省略)。

しかし、以前の qRT-PCR 解析においてノーマライズのためのコントロール遺伝子として採用されていた *histone H4* 遺伝子は、異なる炭素源の違いによって発現量が 2 倍以上変化していることが再現実験により考えられたため（データ省略）、2 つの TSSs 使用率を正確に評価できていないと思われた。そこで、*enoA* の 2 つ TSSs 使用率をより定量的に評価するため、*enoA* の CDS 領域に設計したプライマーから得られる増幅シグナルをノーマライズに用いる qRT-PCR の実験系を新たに構築し（Fig. 3A）、*enoA* の総転写量に対する 2 つの TSSs 由来の転写量の比を求めた。*A. oryzae* の野生株である RIB40 株において、5 種類の炭素源（グルコース、フルクトース、グリセロール、酢酸、エタノール）存在下における qRT-PCR 解析を行った結果、uTSS および dTSS 由来の転写産物量比は、解糖で代謝されるグルコースおよびフルクトース条件でそれぞれ 0.056 ~ 0.22 および 0.71 ~ 0.88 を示した一方、糖新生で代謝される酢酸およびエタノール条件ではそれぞれ 0.84 ~ 0.98 および 0.043 ~ 0.10 を示した（Fig. 3B）。また、解糖および糖新生の両経路によって代謝されるグリセロール条件では、uTSS および dTSS 由来の転写産物量比はそれぞれ 0.32 および 0.61 を示し、解糖と糖新生条件の中間的な TSSs 使用率を示した（Fig. 3B）。5' UTR 内イントロンを挟んだプライマーを用いた RT-PCR 解析を行った結果、5 種類の炭素源を用いた全ての培養条件においてイントロンがスプライシングされていない転写産物（unspliced transcript）の存在は確認されなかった（Fig. 3C）。これは、本 qRT-PCR 実験において、uTSS 由来の unspliced transcript が誤って dTSS 由来の転写産物として検出されることがほとんど起こらないことを裏付けている。以上より、*enoA* の AP における 2 つの TSSs は、発酵性炭素源と非発酵性炭素源の違いに応じて使い分けられることが改めて示された。さらに、ノーザンブロット解析によって *enoA* 総転写産物量はそれぞれの炭素源によって異なることが示された（Fig. 3D）。qRT-PCR およびノーザンブロットの結果より、糖炭素源存在条件における dTSS 由来の転写誘導はグルコース条件、非糖類系炭素源存在条件における uTSS 由来の転写誘導は酢酸条件でそれぞれ最も強く、さらにグルコース条件における dTSS 由来の転写誘導は酢酸条件における uTSS 由来のものよりも強いことが認められた（Fig. 3B, D）。以上の結果から、*enoA* における AP は、解糖と糖新生に関連する炭素源の違いに応答した *enoA* 発現量の調節に関与することが示唆された。

### 1-3-2 *enoA* プロモーター上の保存配列領域の探索

AP による遺伝子発現量制御の意義を知るためには、関連する転写因子の機能を明らかにすることが重要である。そこで、初めに *enoA* プロモーター内に存在するシスエレメント配

列の同定を目指した。もし仮に *Aspergillus* 属糸状菌間でエノラーゼ遺伝子の AP による転写制御機構が保存されている場合、プロモーター上の重要なシスエレメント配列も保存されている可能性がある。以上の仮説に基づいたシスエレメント探索を進めるため、4 種類の *Aspergillus* 属糸状菌 (*A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger*) のエノラーゼ遺伝子上流 1000 bp の配列を用いた MEME 解析(39)を行い、*enoA* プロモーター上のコンセンサスモチーフを検索した。その結果、uTSS と dTSS の上流付近に統計的に有意な 2 つのコンセンサスモチーフ配列 (CE\_1、CE\_2) がそれぞれ見出された (Fig. 4A, B)。

### 1-3-3 転写因子 AcuK / AcuM は *enoA* の uTSS からの転写を促進する

*enoA* の uTSS 上流に位置する CE\_1 内には、AcuK / AcuM の推定結合モチーフが含まれていた (Fig. 4A, B)。AcuK と AcuM は、*A. nidulans* において同定された酢酸存在下の生育に必要な転写因子であり(43)、互いにヘテロダイマーを形成して CC(G)G N<sub>7</sub> CC(G)G の配列モチーフに結合し、糖新生における不可逆な化学反応を触媒するホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) の遺伝子 *acuF* とフルクトース-1,6-ビスホスファターゼ (FBP) の遺伝子 *acuG* の転写を促進する(17, 18)。*A. oryzae* の *acuK* と *acuM* のオーソログ遺伝子の破壊株 ( $\DeltaacuK$ ,  $\DeltaacuM$ ) を作製し、グルコースまたは酢酸を単一炭素源としたプレート上における生育を評価したところ、*A. nidulans* と同様に  $\DeltaacuK$  と  $\DeltaacuM$  株は、酢酸条件においてのみ著しい生育低下を示した (Fig. 5A)。*A. oryzae* の  $\DeltaacuK$  と  $\DeltaacuM$  株では、酢酸培養条件下における PEPCK 遺伝子 *pckA* と FBP 遺伝子 *fbpA* の転写産物量が有意に低下していたことから (Fig. 5B)、*A. nidulans* における *acuK* と *acuM* の機能は *A. oryzae* においても保存されていることが示唆された。

酢酸培養条件下における *A. oryzae* の  $\DeltaacuK$  と  $\DeltaacuM$  株では、uTSS 由来の *enoA* 転写産物量が有意に低下した (Fig. 5B)。さらに、*uidA* を用いたレポーターアッセイにおいて、*enoA* プロモーター上における AcuK / AcuM の推定結合モチーフへの部位特異的変異 (Mut 1、Mut 2) は、グルコース条件においてプロモーター活性に影響を与えない一方 (Fig. 5D)、酢酸培養条件下でプロモーター活性を有意に低下させた (Fig. 5E)。酢酸培養条件下において、Mut 2 変異を有する *enoA* プロモーターで *uidA* を発現させた場合、*uidA* の総転写産物量に対する uTSS と dTSS 由来の転写産物量比は、野生型の *enoA* プロモーターで発現する場合と比べてそれぞれ有意に低下、増加した (Fig. 5F)。また、Mut 2 変異によって uTSS 由来の転写産物量が有意に低下することが、qRT-PCR 解析により認められた (Fig. 5G)。以上の結果から、*A. oryzae* における *acuK* と *acuM* のオーソログ遺伝子は、糖新生条件下における *enoA* の uTSS



由来の転写を促進することが示唆された。

#### 1-3-4 dTSS からの *enoA* 転写促進に重要なシスエレメント配列の同定

MEME 解析によって見出された CE\_2 は、dTSS 上流付近の開始コドン上流-178 ~ -154 nt に位置している (Fig. 4A, B)。着目すべきことに、Toda らによる先行研究の *enoA* プロモーターの deletion 解析によってグルコース存在下の *enoA* 発現に必要であると推定された-224 ~ -121 nt の 104 bp の領域に、CE\_2 は含まれている(15)。さらに Toda らは、全細胞抽出液を用いた EMSA により-195 ~ -181 nt の 15 bp の領域の重要性を指摘しているが(15)、CE\_2 の重要性に関しては報告していない。そこで、*uidA* を用いた *enoA* プロモーターの詳細な deletion 解析を行うことで、どの領域が *enoA* 発現に重要であるかを検討した (Fig. 6A)。-195 ~ -181 nt の 15 bp の領域を欠失させた場合、グルコース存在下におけるプロモーター活性は野生型と比べて 35%程度低下した (Fig. 6B)。一方、CE\_2 をほとんど含む-179 ~ -137 nt の 42 bp の領域を欠失させた場合、プロモーター活性は野生型と比べて有意に 85%程度低下し、これは-224 ~ -121 nt の 104 bp の領域を欠失させた場合と同程度の低下率 (90%) であった (Fig. 6B)。さらに、CE\_2 内に 4 種類の異なる部位特異的変異 (mCS1~4) を導入した結果 (Fig. 6C)、グルコース存在下における有意なプロモーター活性の低下が認められた一方、CE\_2 の外に部位特異的変異 mCS5 を導入した場合は、プロモーター活性の変化は認められなかった (Fig. 6D)。また、グルコース存在下で最も低いプロモーター活性を示した mCS3 変異導入は、酢酸存在下においては有意なプロモーター活性変化を引き起こさなかった (Fig. 6E)。さらに、グルコース存在下において、mCS3 変異を有する *enoA* プロモーターで *uidA* を発現させた場合、総 *uidA* 転写産物量に対する uTSS と dTSS 由来の *uidA* 転写産物量比は、野生型の *enoA* プロモーターで発現する場合と比べてそれぞれ有意に増加、低下した (Fig. 6F)、*histone H4* の転写産物量に対する dTSS 由来の *uidA* 転写産物量は有意に低下した (Fig. 6G)。以上より、グルコース存在下における *enoA* の dTSS からの転写促進に重要なシスエレメントは、先行研究において言及されていた-195 ~ -181 nt の 15 bp の領域ではなく、CE\_2 内に含まれることが示唆された。

#### 1-3-5 *enoA* 発現における 5' UTR 内イントロンの機能解析

*enoA* の uTSS が使用される際の 5' UTR 内では、440 bp に及ぶ長大な領域がイントロンとしてスプライシングされる (Fig. 1A, Fig. 3C)。興味深いことに、この長いイントロンの存在は、他の *Aspergillus* 属糸状菌において共通して存在する。実際、*A. nidulans* と *A. fumigatus*、

*A. niger* のエノラーゼ遺伝子の 5' UTR 内には、384 bp、250 bp、539 bp のイントロンがそれぞれ存在する (Aspergillus Genome Database: <http://www.aspgd.org/>を参照)。 *enoA* プロモーターにおける 5' UTR 内イントロンの機能を調べるため、5'側または 3'側のスプライス部位における部位特異的変異 (5' ssm, 3' ssm) とイントロン欠失変異をそれぞれ有する *enoA* プロモーター活性の評価とレポーター遺伝子 *uidA* の転写産物解析を行った (Fig. 7A)。5' ssm および 3' ssm を導入した結果、dTSS が主に選択されるグルコース存在下ではプロモーター活性に変化が認められなかった一方、uTSS が主に使用される酢酸培養条件下においてはプロモーター活性がほとんど消失した (Fig. 7B, C)。ノーザンブロット解析では、5' ssm および 3' ssm によりイントロンのスプライシングが抑制されたと思われる長い *uidA* 転写産物が酢酸培養条件下で検出された (Fig. 7D)。このことから、イントロンのスプライシングは酢酸条件下における uTSS 由来の転写産物の正常な翻訳に必要であることが示唆された。また、uTSS 由来の転写産物からの翻訳阻害によって酢酸存在下におけるプロモーター活性がほとんど消失したことは、酢酸培養条件下において dTSS からの遺伝子発現がほとんど起こらないことを強く裏付ける結果となった。イントロンを欠失させた場合、dTSS も共に除去されることになるため、グルコース存在下での遺伝子発現は失われることが予想される。実際、イントロンを欠失させた *enoA* プロモーターの活性は、グルコース培養条件下でほとんど失われ、*uidA* 転写産物も検出されなかった (Fig. 7B, D)。一方、酢酸培養条件下では、イントロン欠失プロモーターの活性は野生型と比較して有意に低下し、イントロン欠失プロモーター由来の *uidA* 転写産物量の低下も示唆された (Fig. 7C, D)。上述したように酢酸培養条件下において dTSS から遺伝子発現が起こることはほとんどないため、*uidA* 発現量の低下の原因が dTSS の除去によるものと考えすることはできない。したがって、5' UTR 内のイントロンの存在は、uTSS 由来の転写産物量の増加に関与することが示唆された。さらに、酢酸培養条件下において、イントロン欠失変異と AcuK/AcuM 推定結合モチーフの部位特異的変異を組み合わせたプロモーターの活性はほとんど消失した (Fig. 7E)。このことから、5' UTR 内のイントロンと AcuK/AcuM はそれぞれ独立した機構によって uTSS 由来の遺伝子発現量の増加に関与することが示唆された。

#### 1-3-5 *enoA* の AP の生理的意義

これまでの *uidA* を用いたレポーターアッセイの結果から、mCS3 と 5' ssm の変異は dTSS と uTSS、それぞれの TSS からの遺伝子発現を最も抑制する変異であることが考えられた。そこで、2つの TSSs によって構成される *enoA* の AP の生理的意義を検討するため、*A. oryzae*

の本来の染色体座位にある *enoA* プロモーターを、mCS3 または 5' ssm 変異を有するプロモーターに置換した株を作製した (Fig. 8A)。寒天プレート上において、mCS3 を有するプロモーターに置換した株 (mCS3 株) のグルコース存在条件下における生育は顕著に遅延した一方、酢酸存在下における生育の変化は認められなかった (Fig. 8B)。mCS3 株における *enoA* の TSSs 使用率を qRT-PCR 解析により調べた結果、グルコース培養条件下において uTSS と dTSS の使用率がそれぞれ有意に増加、減少していた一方、酢酸培養条件下における TSSs 使用率に変化は見られなかった (Fig. 8C)。また、ノーザンブロット解析により、mCS3 株のグルコース培養条件下における *enoA* 転写産物量は、野生型の酢酸培養条件下における *enoA* 転写産物量と同程度まで低下していることが示唆された (Fig. 8D)。以上より、mCS3 変異による *enoA* の dTSS からの転写誘導抑制が、グルコース培養条件下における *A. oryzae* の生育遅延に関与することが示唆された。5' ssm 変異を有するプロモーターに置換した株 (5' ssm 株) は、グルコース存在条件下では野生型と同程度の生育が観察された一方、酢酸条件下においてはほとんど生育しなかった (Fig. 8B)。5' ssm 株では、酢酸培養条件下における dTSS 使用率が野生型と比べて有意に増加した一方 (Fig. 8E)、酢酸培養条件下における *enoA* 転写産物量はノーザンブロットによってほとんど検出できない程度に低下していた (Fig. 8F)。5' ssm 株において、5' UTR 内イントロンを挟んだプライマーを用いた RT-PCR 解析を行った結果、イントロンがスプライシングされない転写産物と異常なスプライシングが起きている転写産物が検出された (Fig. 8G)。以上より、5' ssm 変異に起因する uTSS 由来の *enoA* 転写産物量の低下や 5' UTR 内イントロンのスプライシング異常による翻訳阻害が、酢酸培養条件下における生育阻害を引き起こしていることが示唆された。以上の変異導入 *enoA* プロモーター置換株の表現型解析と転写産物解析の結果から、*enoA* の AP における dTSS と uTSS からの転写誘導が、グルコースと酢酸培養条件下における *A. oryzae* の生育に重要であることが示唆された。

#### 1-3-6 解糖系酵素遺伝子群における AP の探索

炭素源の違いに応答する AP の一般性に関する知見を得るため、*enoA* 以外の解糖系酵素遺伝子群における AP の有無を検討した。EST データおよび 5' SAGE データから、グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素遺伝子 *gpdA* においても 2 つの TSSs と 5' UTR 内におけるイントロンの存在が示唆された (Fig. 9A)。しかし、グルコースおよび酢酸培養条件下における *gpdA* の 2 つの TSSs の使用率を qRT-PCR 解析によって調べたところ、炭素源の違いによる顕著な TSSs 使用率の変化は認められなかった (Fig. 9B)。また、5' SAGE データにより、

*gpdA* パラログである *gpdB* には、ただ一つのみ TSS が存在することが示唆された (Fig. 9C)。*enoA*、*gpdA*、*gpdB* 以外の解糖系酵素遺伝子群においては、TSSs の数を特定できるほどの十分なデータが取得されていなかった。そのため、グルコースまたは酢酸を単一炭素源とした培養条件下における 5' RACE 解析により、それぞれの遺伝子における AP の有無を検討した。5' RACE の結果、フルクトースビスリン酸アルドラーゼ遺伝子 *fbaA* においては、2 つの TSSs (uTSS, dTSS) の存在が示唆された (Fig. 9D)。*fbaA* では *enoA* と同様に、グルコース条件で dTSS、酢酸条件で uTSS がそれぞれ優先的に使用されることが示唆された (Fig. 9D)。また、*fbaA* の uTSS 由来の転写産物における 5' UTR 内には、270 bp のイントロンの存在が確認された (Fig. 9D)。さらに、ピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子 *pycA* においても、炭素源の違いによって使用率が変化すると思われる 2 つの TSSs (uTSS, dTSS) の存在が示唆された (Fig. 9E)。*pycA* では、2 つの TSSs のうち、uTSS の使用頻度がグルコース条件で増加する傾向が見られたため (Fig. 9E)、*enoA* や *fbaA* とは異なる TSSs 使用様式を有することが考えられた。また、*pycA* の uTSS 由来の転写産物における 5' UTR では 3 種類の選択的スプライシングが起こる可能性が示唆された (Fig. 9E)。グルコース 6 リン酸イソメラーゼ遺伝子 *pgiA*、ホスホグリセリン酸キナーゼ遺伝子 *pgkA*、ホスホグリセリン酸ムターゼ遺伝子 *gpmA* の 3 遺伝子においては、複数の TSSs と 5' UTR 内におけるイントロンの存在が示唆されたが、炭素源の違いに応答した明瞭な TSSs の使い分けは認められなかった (Fig. 10A-C)。トリオースリン酸イソメラーゼ遺伝子 *tpiA* においても複数の TSSs の存在が示唆されたが、5' UTR 内におけるイントロンの存在と炭素源の違いに応答した明瞭な TSSs の使い分けは認められなかった (Fig. 10D)。ピルビン酸キナーゼ遺伝子 *pkiA* においては、グルコース、酢酸条件共にただ 1 つの TSS が用いられることが示唆され、5' UTR 内におけるイントロンの存在は認められなかった (Fig. 10E)。RT-PCR 解析により、解糖または糖新生経路において不可逆な反応を触媒する酵素遺伝子であるホスホフルクトキナーゼ遺伝子 *pfkA* と糖新生において不可逆な反応を触媒する酵素遺伝子である *fbpA* および *pckA* はグルコース条件または酢酸条件でのみそれぞれ発現が認められたため (データ省略)、これら 3 遺伝子においては発現が確認される条件下でのみ 5' RACE 解析を行った。その結果、3 遺伝子共にただ 1 つの TSS が用いられることが示唆され、5' UTR 内におけるイントロンの存在は認められなかった (Fig. 10F-H)。以上より、炭素源の違いに応じて使い分けられる複数の TSSs を有する遺伝子として *fbaA* および *pycA*、TSSs の厳密な使い分けは認められないものの複数の TSSs を有する遺伝子として *gpdA* と *pgiA*、*pgkA*、*gpmA* が見出された (Fig. 11)。本解析結果から、炭素源の違いに応答する AP は全ての解糖系酵素遺伝子に共通するものではないものの、

*enoA* 特異的なものではないことが明らかとなった。

#### 1-3-7 *fbaA* プロモーター上の *enoA* における推定シスエレメント配列は遺伝子発現に関与する

*enoA* と同様の AP の存在が認められた *fbaA* のプロモーター上には、uTSS 上流付近に AcuK/AcuM の結合モチーフ、dTSS の上流付近に *enoA* における CE\_2 内の推定シスエレメント配列がそれぞれ存在していた (Fig. 12A)。そこで、これらの *enoA* における推定シスエレメントの類似配列への部位特異的変異導入が *fbaA* プロモーター活性に及ぼす影響を、*uidA* を用いたレポーターアッセイによって調べた。*enoA* の uTSS 由来の転写促進に関与するシスエレメントの類似配列 SE1 の AcuK/AcuM の結合モチーフに変異を導入したところ、グルコース条件ではプロモーター活性に変化が認められなかった一方、酢酸条件下ではプロモーター活性の有意な低下が認められた (Fig. 12A-C)。*enoA* の dTSS 由来の転写促進に関与するシスエレメントの類似配列 SE2 に変異を導入した場合は、グルコース条件において有意なプロモーター活性の低下が認められた一方、酢酸培養条件ではプロモーター活性の有意な変化が見られなかった (Fig. 12A, D, E)。以上の結果から、グルコースまたは酢酸培養条件において *enoA* シスエレメントの類似配列が、*fbaA* 発現量の増加に関与することが示唆された。

### 1-4 考察

解糖と糖新生は、細胞のエネルギー獲得と細胞構成成分の合成に関与する一次代謝系である。日本の重要な醸造産業用微生物 *A. oryzae* のエノラーゼ遺伝子 *enoA* は、発酵性炭素源と非発酵性炭素源の違いによって使い分けられる 2 つの TSS (uTSS、dTSS) を含む AP によって、その転写が制御される。この AP による転写制御機構を解明することは、*A. oryzae* における解糖系酵素遺伝子の発現調節を介した環境適応戦略を理解する上で重要であるだけでなく、真菌類における AP の学術的理解を促進する上で重要である。

本章では、まず *A. oryzae* における *enoA* の AP の存在意義に検討を加えた。*enoA* では、TSS の違いに起因するタンパク質一次構造のバリエーションの存在と 5' UTR の違いに基づく翻訳効率の違いが認められなかったことから (Fig. 1B, 2)、*enoA* の AP は環境の違いに応答した転写産物量の調節においてのみ重要であることが考えられた。実際、dTSS が優先的に使用される発酵性炭素源条件下の *enoA* 転写産物量は、uTSS が優先的に使用される非発酵性

炭素源条件下よりも多い傾向を示した (Fig. 3B,D)。次に、*enoA* の AP による転写制御機構を調べた。*enoA* プロモーター上のシスエレメントを絞り込む目的で、*Aspergillus* 属糸状菌間のエノラーゼ遺伝子のプロモーター配列におけるコンセンサスモチーフを *in silico* 解析によって探索したところ、高度に保存されている 2 か所の配列領域 (CE\_1、CE\_2) を見出し (Fig. 4)、これらの中に *enoA* 発現に重要なシスエレメントとして機能する配列が含まれていることを示した (Fig. 5, 6)。また、*enoA* の uTSS 由来の転写産物における 5' UTR 内イントロンのスプライシングが正常な翻訳に必要であること、およびイントロン配列の存在が uTSS 由来の転写産物量の増加に関連することが示唆された (Fig. 7)。以上の解析によって特定された *enoA* 発現を最も抑制する変異を染色体上の *enoA* プロモーターに導入し、変異導入株の表現型と転写産物を解析したところ、AP 内の uTSS と dTSS からの転写誘導が酢酸とグルコース条件における生育に重要であることが示唆された (Fig. 8)。最後に、*enoA* 以外の解糖系酵素遺伝子群における AP の有無を網羅的に検討し、5 遺伝子に複数の TSSs と 5' UTR 内イントロンの存在を見出した (Fig. 9)。それらの遺伝子の内、特に *enoA* と非常に良く類似した AP を有する *fbaA* は、*enoA* における推定シスエレメントと同じ配列因子が *fbaA* の発現量増加に関与することが示唆され (Fig. 12)、*enoA* と共通した転写制御機構を有することが考えられた。

本研究成果から、*enoA* における AP の存在意義の一つは、環境中の炭素源の種類に応じてエノラーゼ発現量を転写レベルで適切に制御することだと考えられる。*enoA* の AP の dTSS からの転写誘導は、グルコース条件における *enoA* 高発現に重要であることが示され (Fig. 3B-D)、さらに推定シスエレメントへの変異 (mCS3) 導入による dTSS からの転写誘導抑制は、グルコース含有培地における *A. oryzae* の生育低下に繋がることを示唆された (Fig. 8A-D)。このことから、AP 内の dTSS からの *enoA* 高発現は、少なくともグルコースが存在する条件下の *A. oryzae* の生育において重要であると思われる。序論で述べたように、*A. oryzae* において *enoA* を含む解糖系酵素遺伝子群は、糖炭素源存在下で一様に高発現することが知られる (9, 10)。一般的に、解糖経路の基質レベルのリン酸化による ATP の獲得は、酸化的リン酸化によるものと比較して迅速であると考えられている。したがって、*A. oryzae* における dTSS からの *enoA* 高発現は、細胞内のエノラーゼ濃度を上昇させて解糖経路の代謝流量増加を支えることで、グルコース存在下における迅速な生育に関与しているのかもしれない。*enoA* プロモーター上の mCS3 導入 *A. oryzae* 株では、デンプン含有培地における生育低下も観察されているため (データ省略)、dTSS からの *enoA* 高発現機構は日本酒製造のような醸造産業現場の発酵過程における *A. oryzae* の生育に重要な意味を持つと思われる。

一方、uTSS 由来の *enoA* 発現を著しく阻害する 5' UTR 内イントロンのスプライス部位における変異を *enoA* プロモーター上に導入すると、*A. oryzae* の酢酸存在条件下における生育がほとんど阻害された (Fig. 8A, B)。このことは、uTSS からの *enoA* 発現が酢酸存在下における *A. oryzae* の生育に必要不可欠であることを示唆している。uTSS 使用に基づく *enoA* 転写制御の具体的な意義は現時点で明確でないが、糖新生による炭素源代謝の需要に応じた発現量調節において重要な意義を持つのではないかと予想している。*A. oryzae* では、酢酸存在条件下の *enoA* の uTSS からの転写促進に、*A. nidulans* で同定された転写因子 AcuK と AcuM のオーソログが関与することが示唆された (Fig. 5)。*A. nidulans* において、AcuK / AcuM 制御下にある糖新生に特異的に必要な酵素遺伝子 *acuF* と *acuG* のプロモーター活性は、*acuF* や細胞内リンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 *mdhC* が欠失した遺伝的背景で増加することから、潜在的に糖新生の基質となり得るリンゴ酸の細胞内濃度の上昇が AcuK / AcuM による転写活性化に重要である可能性が指摘されている(17, 18)。今後、AcuK / AcuM の活性化機構に関する研究を進めることで、*enoA* の AP における uTSS 使用の意義に関して理解が進むことが期待される。

本研究により、*enoA* プロモーター上の新規シスエレメント配列が特定されたものの (Fig. 5, 6)、*enoA* の AP による転写制御機構の全容解明には至らなかった。特に、*enoA* の dTSS からの転写誘導に関与する転写因子は不明であり、その同定は dTSS 使用の意義を分子機構から探る上で重要な課題である。既に、以下に述べるいくつかの方針に沿って転写因子の探索を試みているが、有望な転写因子候補の同定には至っていない。まず、酵母 *S. cerevisiae* において解糖系酵素遺伝子群の発現に関与する転写因子として報告されている GCR1、GCR2、RAP1、REB1、ABF1 および SGC1 (14)の *A. oryzae* におけるオーソログを blastp 検索によって探索したが、高いホモロジーを示す遺伝子の存在はいずれの因子においても見出されなかった (データ省略)。おそらく、*A. oryzae* の *enoA* 高発現には、*S. cerevisiae* とは全く異なる分子機構が働いていることが予想される。そのため、ホモロジー検索から転写因子を探索することは困難であると思われる。そこで、Yeast One Hybrid 法により、*A. oryzae* の cDNA ライブラリーから推定シスエレメントである CE\_2 内の CGGTGA 配列に結合能を有する因子を探索することを試みたが、おそらく酵母由来のタンパク質因子が CGGTGA 配列に結合能を持つことが原因で、適切なスクリーニング系の構築に至らず解析を行うことができなかった。一方、*A. oryzae* において bHLH 型の DNA 結合ドメインを有する転写因子 SclR が細胞内の解糖系酵素量の増加に関与するとの報告があったため(44)、*sclR* 遺伝子破壊株の *enoA* における TSSs 使用率を qRT-PCR によって調べたが、野生型と比較した TSSs 使用率の

顕著な変化は確認されなかった（データ省略）。また、（公財）野田産業科学研究所と東北大学によって造成された *A. oryzae* の転写因子破壊株ライブラリーから、グルコース含有選択培地でヘテロカリオンとして取得された株と CAGE 解析（第二章で詳述）によって酢酸条件と比べてグルコース条件で高発現すると推定された転写因子の破壊株を選抜し、グルコースと酢酸培地におけるコロニーの大きさを指標としたスクリーニングを行ったが、有望な候補株取得には至らなかった。今後は、*A. oryzae* の核抽出物と CE\_2 内の CGGTGA 配列を用いた DNA 配列特異的アフィニティクロマトグラフィー等の生化学的手法による探索を試みる必要があると考えている。

本章では、*enoA* 以外の複数の解糖系酵素遺伝子において、AP もしくは複数の TSSs の存在を示した (Fig. 11)。いずれの遺伝子においても、TSSs の違いに起因してタンパク質一次構造が多様化する可能性は認められなかったため、主に遺伝子発現量の調節において AP もしくは複数の TSSs の存在が重要な意味を持つ可能性が考えられる。特に、*fbaA* は、*enoA* と非常によく類似した AP を有しており (Fig. 9D)、*fbaA* プロモーター上の *enoA* の推定シスエレメントと一致する配列が遺伝子発現に関与すること示唆された (Fig. 12)。このことから、*fbaA* における AP の意義は *enoA* のものと一部共通する可能性が考えられる。*enoA* と *fbaA* の uTSS 使用に関連する AcuK / AcuM 結合モチーフ配列は、糖新生に特異的に必要な *fbpA* や *pckA* に加えて、*gpdA* と *pgkA* のプロモーター上にも存在している（データ省略）。また、*enoA* と *fbaA* の dTSS 使用に関連する推定シスエレメント配列 CGGTGA は、*fbpA* と *pckA* のプロモーター上には存在しない一方、解糖経路の全ての化学反応ステップに関与すると推定される遺伝子群 (*hxA*, *pgiA*, *pfkA*, *tpiA*, *gpdA*, *pgkA*, *gpmA*, *pkiA*, *pycA*) のプロモーター上に存在している（データ省略）。特に、*enoA* や *fbaA* とは異なるタイプの AP の存在が示唆された *pycA* においては (Fig. 9E)、グルコース条件で特異的に使用される uTSS の上流付近の -777 ~ -772 nt の位置に CGGTGA 配列が存在する。以上の 2 つの推定シスエレメント配列が、*enoA* と *fbaA* 以外の遺伝子の発現に関与するかどうかは不明であるが、それらの配列に基づいた各遺伝子のシスエレメント探索を進めることで、シスエレメント配列と AP の関連性や解糖系酵素遺伝子群における転写制御機構の全容解明に向けた新規知見が得られるかもしれない。

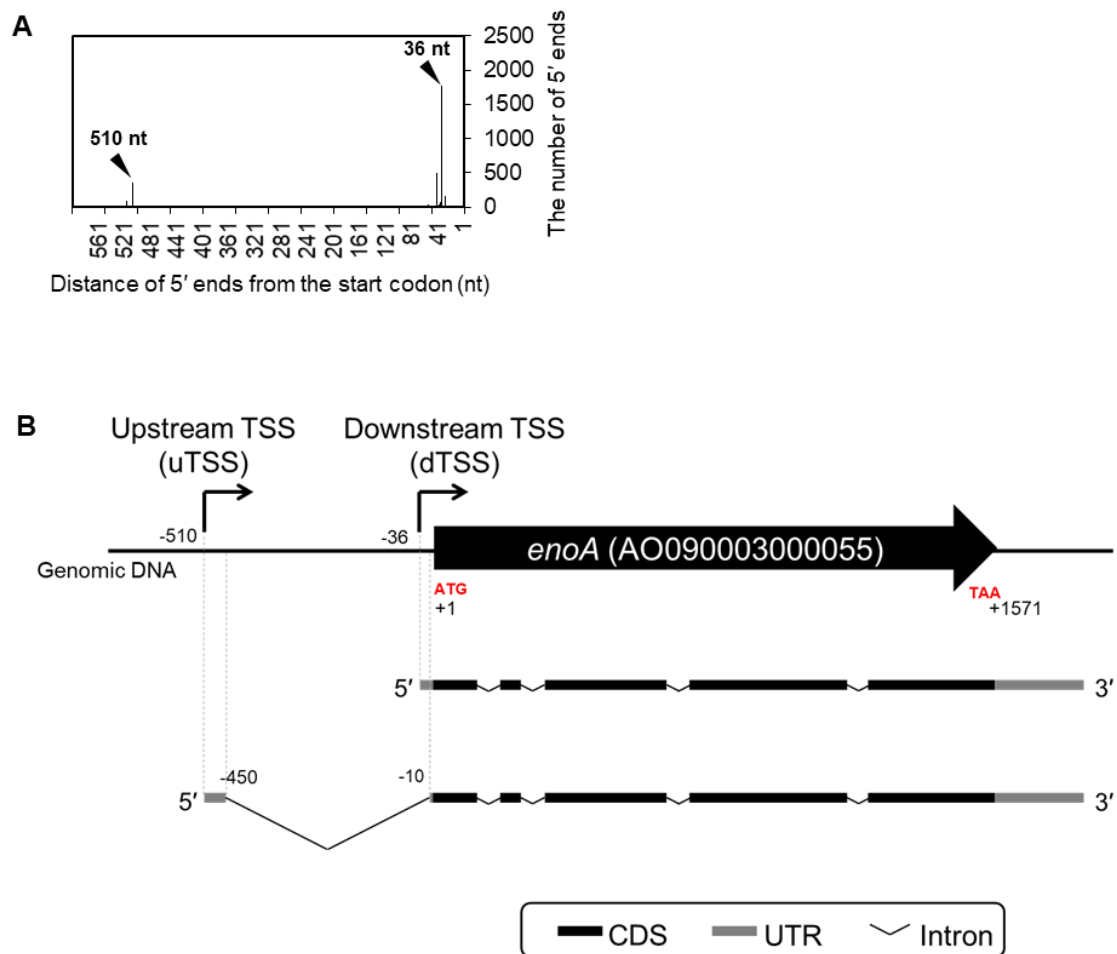
本研究において検討した解糖系酵素遺伝子の内、複数 TSSs の存在が示唆された全ての遺伝子には 5' UTR 内にイントロンが存在した一方、単一の TSS を有する遺伝子の 5' UTR 内にイントロンは確認されなかった（結果 1-3-6）。このことから、5' UTR 内におけるイントロンと複数の TSSs の存在には関連性があることが考えられる。担子菌酵母 *Cryptococcus*



*neoformans* における先行研究では、5'UTR にイントロンがある遺伝子の TSSs の数はイントロンをもたない遺伝子よりも多い傾向にあることが指摘されている(45)。5'UTR 内イントロンと複数の TSSs の相関性は、真菌類において普遍的にみられるものなのかもしれない。5'UTR 内におけるイントロンの一般的な意義は、翻訳阻害の回避であると予想している。*enoA* プロモーターにおいて、5'UTR 内イントロンのスプライス部位に変異を導入してスプライシングを抑制すると、細胞内に転写産物が存在するにも関わらず遺伝子発現はほとんど失われた (Fig. 7A-D)。これは、*enoA* におけるイントロンのスプライシングが、uTSS 由来の転写産物の正常な翻訳に必要であることを示唆している。*enoA* におけるイントロンの配列を参照すると 3 つの短い open reading frame (ORF) が存在していたことから、イントロンがスプライシングされない uTSS 由来の転写産物では、これらの ORF が翻訳を著しく阻害する upstream ORF (uORF, (46)) として働くことが考えられた。このような潜在的な uORF は、*fbaA* や *pgiA* の 5'UTR 内イントロン内においても認められた。したがって、*enoA* や *fbaA*、*pgiA* の 5'UTR 内におけるスプライシングについては、5'UTR 内における uORF による翻訳阻害を回避する上で重要であると思われる。一方、他の複数の TSSs を有する遺伝子の 5'UTR 内イントロンにおいては、uORF や本来の開始コドンの上流に位置する開始コドン配列因子である upstream ATG (uATG) が見られなかった。これらの遺伝子におけるイントロンの存在意義は不明であるが、本来の TSS の上流側の位置に TSSs が獲得されることで、必然的に 5'UTR が長くなることによる翻訳効率の低下を回避する上で重要なのではないかと考えている。実際、*enoA* や *fbaA* においては 440 bp や 229 bp の *Aspergillus* 属糸状菌にとっては極めて長いイントロンが存在している (Fig. 1B, 9C)。また、本研究で見出された複数の TSSs を有する遺伝子では、TSSs 同士の距離と 5'UTR 内イントロンの長さには、ある程度の相関が認められる ( $R^2 = 0.66$ )。 *C. neoformans* においても、5'UTR におけるイントロンは CDS や 3'UTR 内のイントロンと比べて長い傾向にあることが指摘されている(45)。本来の TSS に加えて開始コドンからより離れた位置に TSS が獲得されるためには、スプライシングされる上で必要なシス配列因子を 5'UTR 内に獲得し、5'UTR を翻訳効率が保持される長さにする必要があったのではないかと想像される。一方、*enoA* における 5'UTR 内イントロンは、uTSS 由来の転写産物量の増加にも関与することが示唆された (Fig. 7A-D)。このイントロンを介した発現量上昇効果 (Intron Mediated Enhancement: IME) が、複数の TSSs の有無と普遍的に関連するものであるかどうかは不明である。*enoA* 以外の他の遺伝子においても、イントロン欠失が遺伝子発現量に及ぼす影響を検討する必要がある。また、*enoA* における IME の分子機構も現時点では分からない。IME は、真菌や植物、動物に至るまで真核

生物に報告されている現象であるが、種や遺伝子毎に異なる機構が提唱されている(47-50)。*enoA* における IME をモデルとした分子機構解明を進めることは、*Aspergillus* 属糸状菌における IME 機構を理解する上で役立つと思われる。

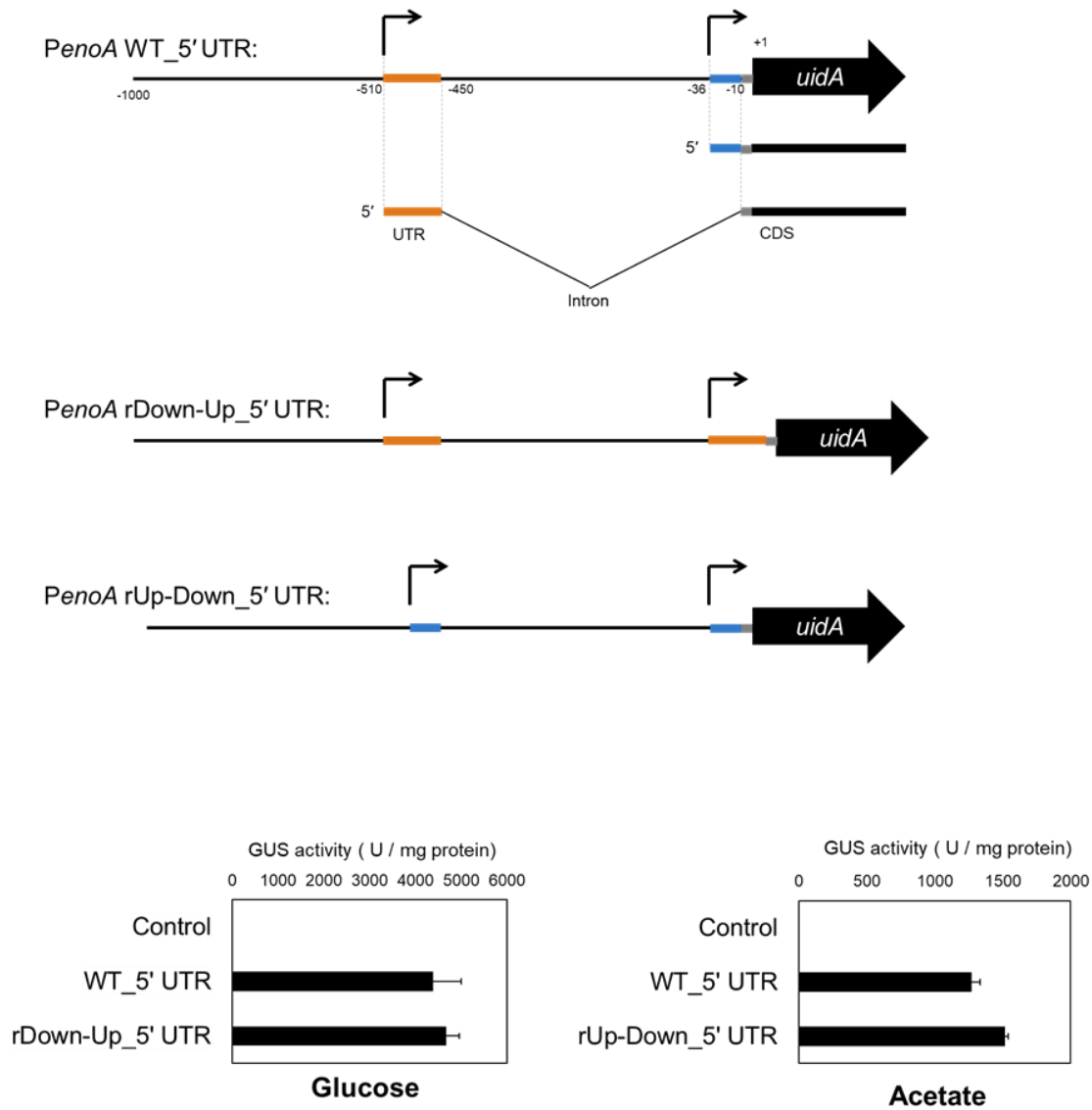
本章では、*enoA* の AP に基づく転写制御機構の意義について検討を加え、発酵性炭素源と非発酵性炭素源の違いに応答した転写量調節における AP の意義を明確にした。また、*enoA* の AP による分子機構の詳細について解析し、新規シスエレメントの存在と 5'UTR 内イントロンの機能を明らかにした。さらに、*enoA* 以外の解糖系酵素遺伝子群における AP を探索し、AP が *enoA* 特異的なものではなく、他の遺伝子においても存在すること新たに示した。以上の研究成果は、*A. oryzae* における解糖系酵素遺伝子の転写制御機構解明に向けた基礎的知見であるとともに、真菌類における AP の新たな解析事例を提供するものである。



**Fig. 1 Two TSSs in *A. oryzae enoA* promoter.**

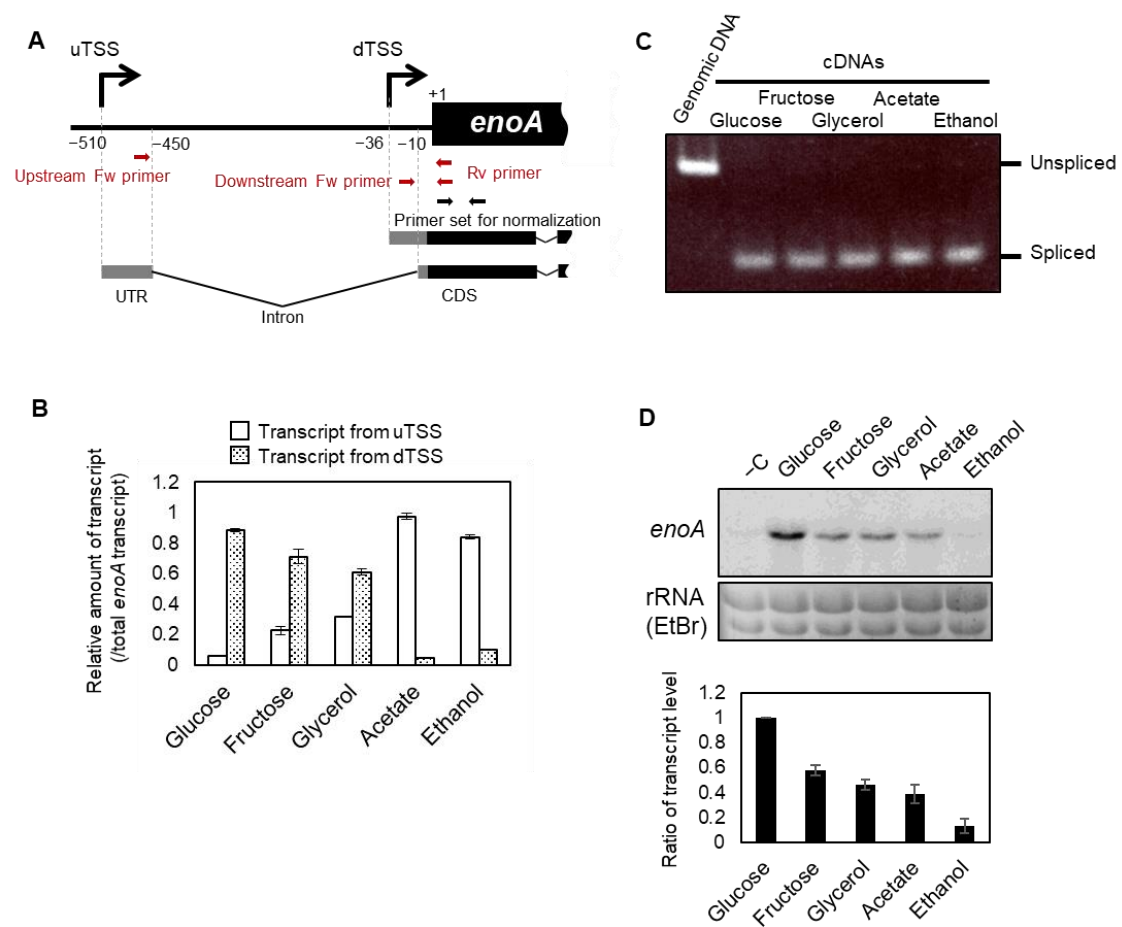
**a** *enoA* 5' end clones obtained by 5' SAGE (51). Total RNA samples were prepared from mycelia grown in YPD liquid medium for 24 h or wheat bran solid medium for 30 h. The two RNA samples were mixed and used for 5' SAGE. Numbers represent the 5' end peak location (arrows).

**b** Schematic representation of transcriptional units deduced by EST and 5' SAGE data in *A. oryzae enoA*. Numbers represent the nucleotide positions relative to the adenine nucleotide of the start codon (+1).



**Fig. 2 The effect of two 5' UTRs on *enoA* translation efficiency.**

Top panel: Schematic representation of the *enoA* promoter plus the 5' UTR for GUS gene (*uidA*) expression. The uTSS-derived 5' UTR (Up\_5' UTR) is shown with an orange bold line and the dTSS-derived 5' UTR (Down\_5' UTR) is shown with a blue bold line. The Down\_5' UTR was replaced with the Up\_5' UTR in *PenoA* rDown-Up\_5' UTR. The Up\_5' UTR was replaced with the Down\_5' UTR in *PenoA* rUp-Down\_5' UTR. Bottom panel: GUS activity of the transformants harboring the *uidA* expression constructs from the top panel in glucose or acetate culture conditions. Mycelia samples were grown in MM containing 2% glucose for 36 h or 2% sodium acetate for 72 h. Values are the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors.



**Fig. 3 *enoA* alternative TSS use depends on carbon source.**

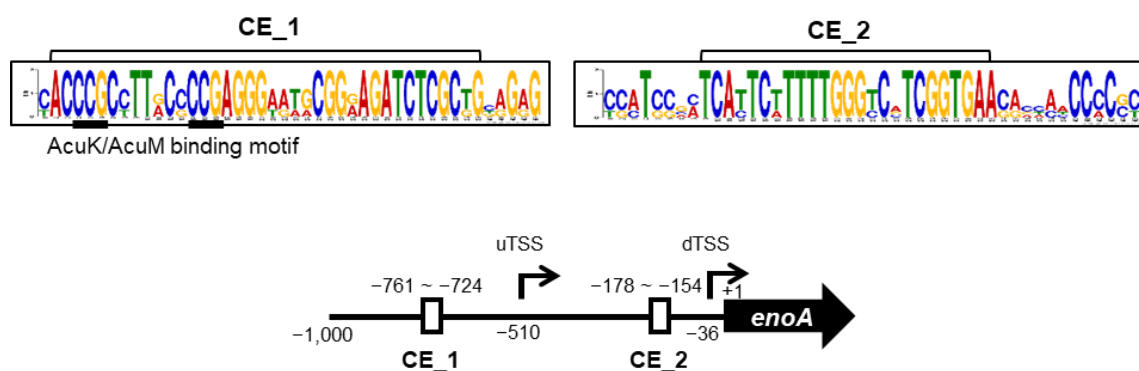
**a** Schematic representation of two TSSs in *enoA* and the primer binding sites used for qRT-PCR analysis. Numbers represent the positions of each TSS relative to the adenine nucleotide of the start codon (+1). The two primer sets shown in red discriminate between the two *enoA* transcript variants, because each Fw primer anneals to a distinct TSS-derived 5' UTR. The primers shown in black were used to obtain the control signal for normalization. qRT-PCR using these primer sets could estimate the TSS-derived transcript levels relative to the total *enoA* transcript.

**b** uTSS or dTSS-derived *enoA* transcript levels depending on the carbon source. Total RNA samples were prepared from mycelia grown in MM containing 2% glucose for 36 h and then transferred to fresh MM without a carbon source or containing 2% glucose, fructose, glycerol, sodium acetate, or ethanol for 4 h. Values represent the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors

**c** *enoA* RT-PCR analysis. The upstream Fw primer and Rv primer of the primer sets for normalization

shown in Fig. 1B were used.

**d** Top panel: Northern blot analysis on *A. oryzae enoA*. Total RNA samples were prepared from mycelia grown in MM containing 2% glucose for 36 h and then transferred to fresh MM without a carbon source or containing 2% glucose, fructose, glycerol, sodium acetate, or ethanol for 4 h. Bottom panel: *enoA* transcript level quantification. Transcript signal intensity was normalized using the 18S rRNA signal. The amount of *enoA* transcript in the presence of glucose was set to 1.0. Values represent the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors.

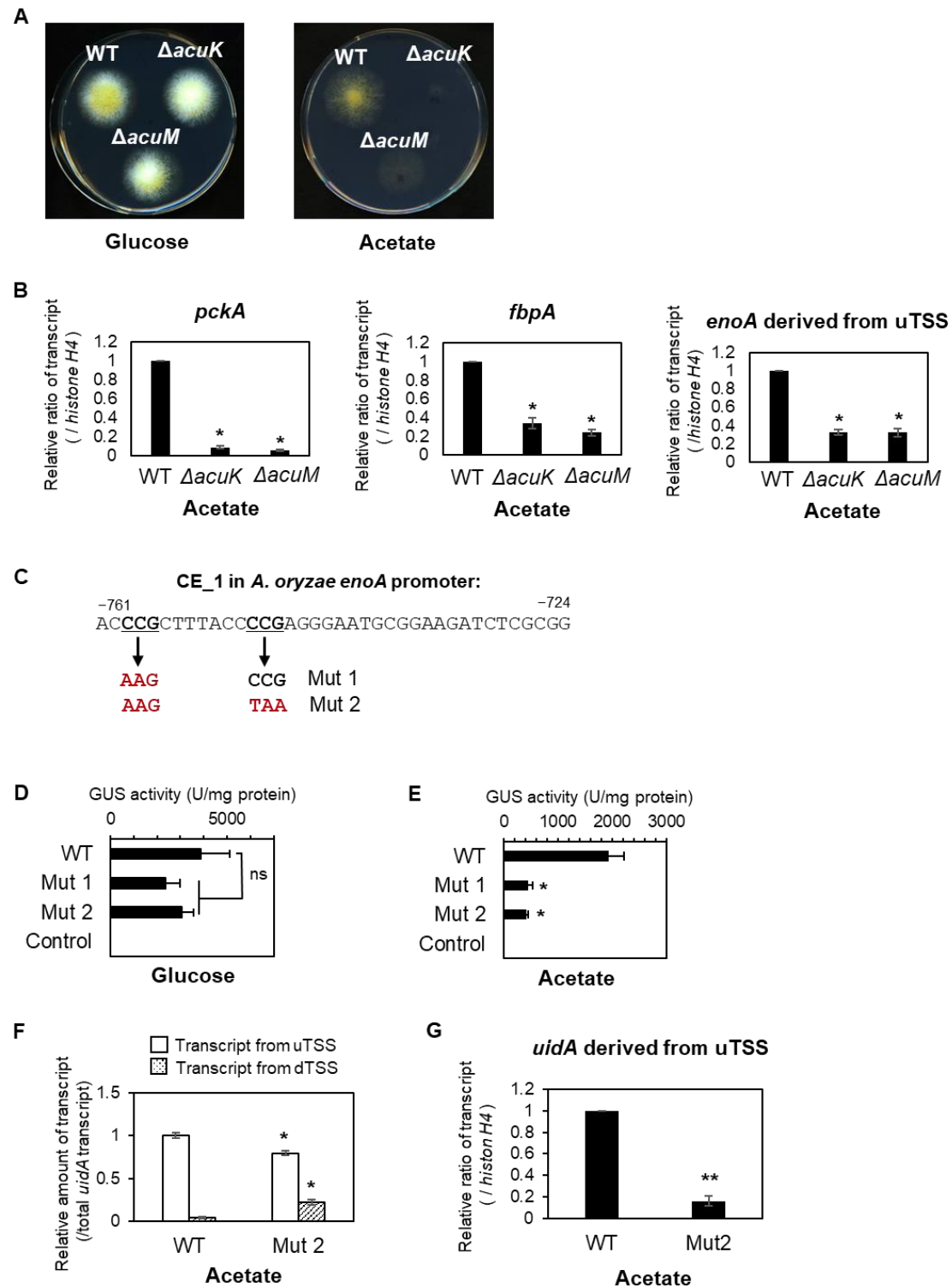


**Fig. 4 Two highly conserved sequences in enolase-encoding gene promoters among *Aspergilli***

The sequence of two consensus elements (CE\_1, CE\_2) within enolase-encoding gene promoters in *Aspergilli* and schematic representation of the CE\_1 and CE\_2 positions in the *A. oryzae enoA* promoter. Motif identification was performed using MEME software on four 5' sequences of 1,000 bp from the start codon in four *Aspergillus* species: *A. niger*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, and *A. oryzae*. Numbers represent the CE\_1 and CE\_2 positions relative to the adenine nucleotide of the start codon (+1).







**Fig. 5** AcuK and AcuM transcription factors upregulate *enoA* transcription from uTSS.

**a** Growth of  $\Delta acuK$  and  $\Delta acuM$  strains on glucose or acetate. Approximately  $1.0 \times 10^3$  conidiospores from each strain were grown on MM agar plates containing 2% glucose or sodium acetate at 30 °C for

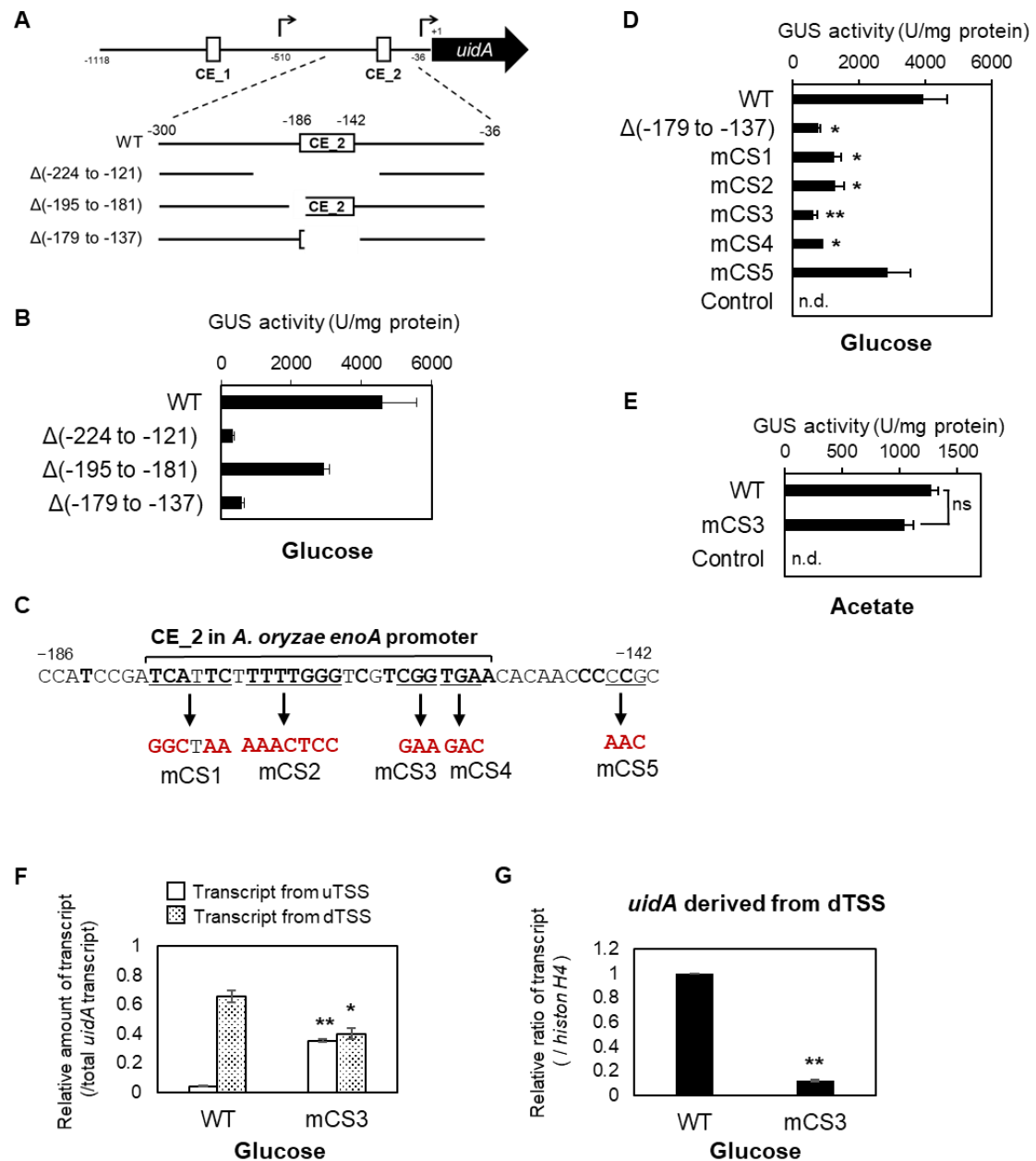
4 days. The  $\Delta ligD::sC$  strain complemented by the wild-type *niaD* gene was used as a wild type strain. **b** *pckA*, *fbpA* and *enoA* transcription levels in wild-type,  $\Delta acuK$ , and  $\Delta acuM$  strains in the presence of acetate. The primer set used for amplifying the uTSS-derived *enoA* transcript is shown in Fig. 3A. The amount of the transcript was normalized to *histone H4*. Total RNA samples were prepared from mycelia grown in MM containing 2% glucose for 36 h and then transferred to fresh MM with 2% sodium acetate for 4 h. Values represent the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors. *P*-values were calculated by Student's *t*-test. \*: *P* < 0.05 versus WT.

**c** The CE\_1 sequence in the *A. oryzae enoA* promoter and mutations used for the GUS reporter assay. The AcuK/AcuM binding motif in the CE\_1 sequence is bold and underlined. The base substitutions are shown in red.

**d** and **e** GUS activity of the transformants harboring GUS gene (*uidA*) expression constructs in glucose (**d**) or acetate (**e**) culture conditions. *uidA* was expressed by the *enoA* promoter with or without mutations in the AcuK/AcuM binding motif. Mycelia were grown in MM containing 2% glucose for 36 h or 2% sodium acetate for 72 h. Values represent the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors. *P*-values were calculated by Student's *t*-test. \*: *P* < 0.05 versus WT. ns: not significant.

**f** uTSS or dTSS-derived GUS gene (*uidA*) transcript levels in transformants harboring *uidA* expression constructs in acetate culture conditions. *uidA* was expressed by the *enoA* promoter with or without the Mut 2 mutation shown in Fig. 5C. Primer sets were designed using the same strategy as in Fig. 3A. Total RNA samples were prepared from mycelia grown in MM containing 2% glucose for 36 h and then transferred to fresh MM containing 2% sodium acetate for 4 h. Values represent the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors. *P*-values were calculated by Student's *t*-test. \*: *P* < 0.05, \*\*: *P* < 0.01 versus uTSS- or dTSS-derived transcript in WT.

**g** uTSS-derived *uidA* transcript levels in transformants harboring *uidA* expression constructs in acetate culture conditions. The primer set for amplifying the uTSS-derived *uidA* transcript were used. The amount of the *uidA* transcript was normalized to *histone H4*. The same total RNA samples as ones in Fig. 5F were used for this analysis. Values represent the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors. *P*-values were calculated by Student's *t*-test. \*\*: *P* < 0.01 versus WT.



**Fig. 6 CE\_2 involves in the upregulation of *enoA* transcription from dTSS**

**a** Schematic representation of *enoA* promoter deletions around CE\_2 for GUS gene (*uidA*) expression. Numbers represent the locations of each TSS and CE\_2 relative to the adenine nucleotide of the start codon (+1).

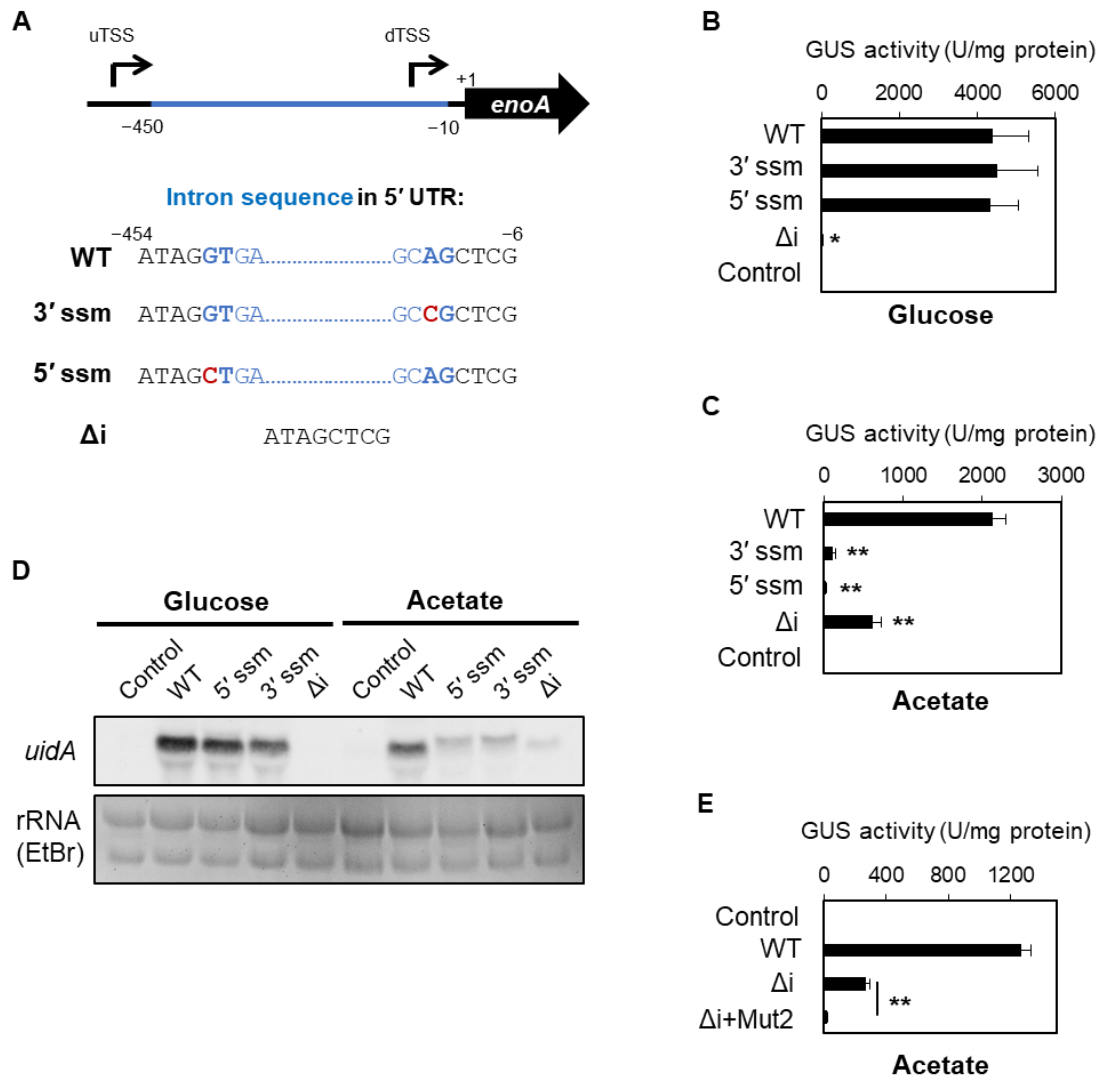
**b, d and e** GUS activity of the transformants harboring GUS gene (*uidA*) expression constructs in glucose (**b** and **d**) or acetate (**e**) culture conditions. *uidA* was expressed by the *enoA* promoter with or without mutations in the 5' UTR intron. Mycelia were grown in MM containing 2% glucose for 48 h

or 2% sodium acetate for 72 h. Values are the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors. *P*-values were calculated by Student's *t*-test. \*: *P* < 0.05, \*\*: *P* < 0.01 versus WT.

c The CE\_2 sequence in the *A. oryzae enoA* promoter and mutations used for GUS reporter assays. The conserved nucleotides are represented in bold and the base substitutions of the mutations are shown in bold red.

f uTSS or dTSS-derived GUS gene (*uidA*) transcript levels in transformants harboring *uidA* expression constructs in acetate culture conditions. *uidA* was expressed by the *enoA* promoter with or without the mCS3 mutation shown in Fig. 6C. Primer sets were designed using the same strategy as in Fig. 3A. Total RNA samples were prepared from mycelia grown in MM containing 2% glucose for 36 h and then transferred to fresh MM containing 2% sodium acetate for 4 h. Values represent the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors. *P*-values were calculated by Student's *t*-test. \*: *P* < 0.05, \*\*: *P* < 0.01 versus uTSS- or dTSS-derived transcript in WT.

g dTSS-derived *uidA* transcript levels in transformants harboring *uidA* expression constructs in glucose culture conditions. The primer set for amplifying the dTSS-derived *uidA* transcript were used. The amount of the *uidA* transcript was normalized to *histone H4*. The same total RNA samples as ones in Fig. 5F were used for this analysis. Values represent the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors. *P*-values were calculated by Student's *t*-test. \*\*: *P* < 0.01 versus WT.



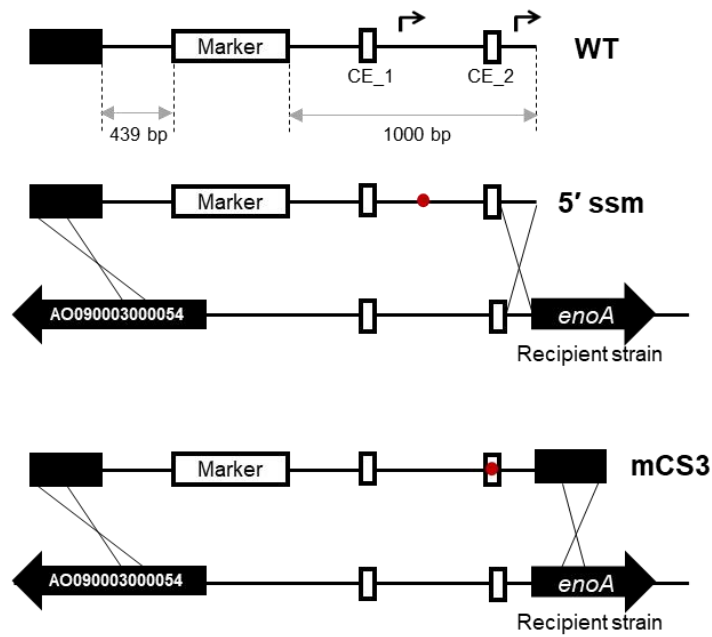
**Fig. 7 Functional analysis of the 5' UTR intron in *enoA* promoter**

**a** Schematic representation of 5' UTR intron in the *A. oryzae enoA* promoter and mutations used for the GUS reporter assay. Intron sequence is shown in blue. 5' and 3' splice sites of the intron sequence are represented in bold blue and the base substitution of mutations is shown in bold red.

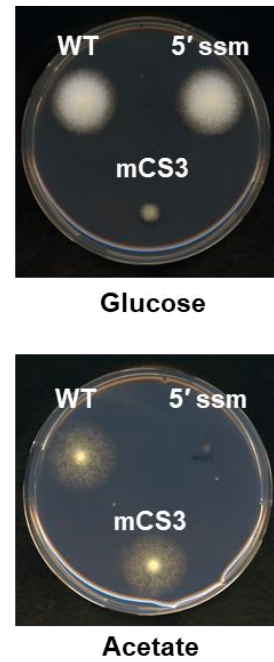
**b, c and d** GUS activity of the transformants harboring GUS gene (*uidA*) expression constructs in glucose (**b**) or acetate (**c and d**) culture conditions. *uidA* was expressed by the *enoA* promoter with or without mutations in the 5' UTR intron and in the AcuK/AcuM binding motif. Mycelia were grown in MM containing 2% glucose for 48 h or 2% sodium acetate for 72 h. Values are the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors. *P*-values were calculated by Student's *t*-test. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  versus WT.

**d** Northern blot analysis on *uidA*. Total RNA samples were prepared from mycelia grown in MM containing 2% glucose for 36 h and then transferred to fresh MM without a carbon source or containing 2% glucose or sodium acetate for 4 h.

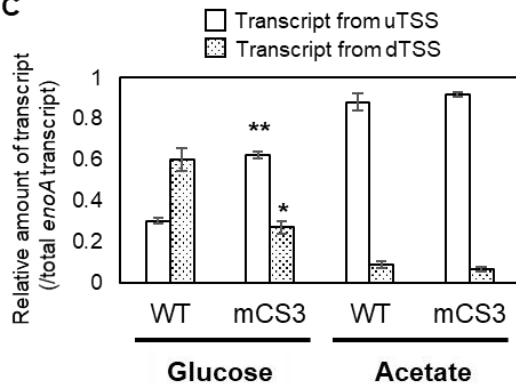
**A**



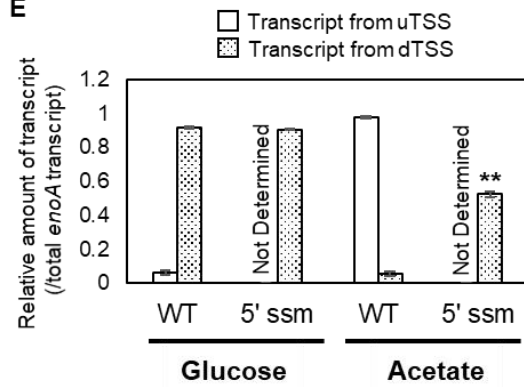
**B**



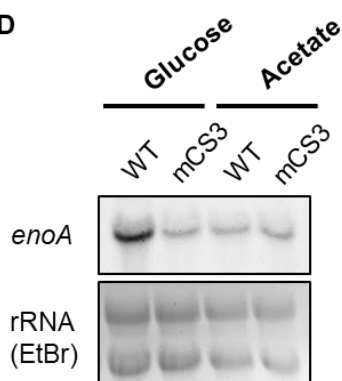
**C**



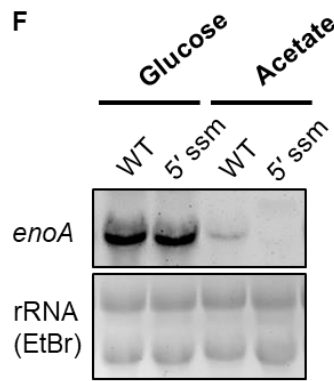
**E**



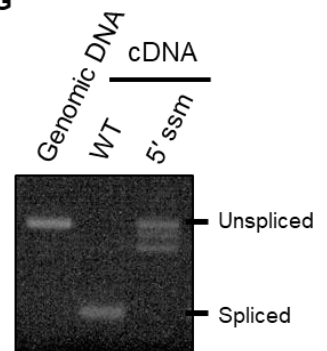
**D**



**F**



**G**



**Fig. 8 The effect of mCS3 or 5' ssm mutation within *enoA* promoter in *A. oryzae* physiology**

**a** Schematic representation of the replacement of native *enoA* promoter with the promoter without or with mCS3 shown in Fig. 6C or 5' ssm shown in Fig. 7A. Position of each mutation is shown in a red dot.

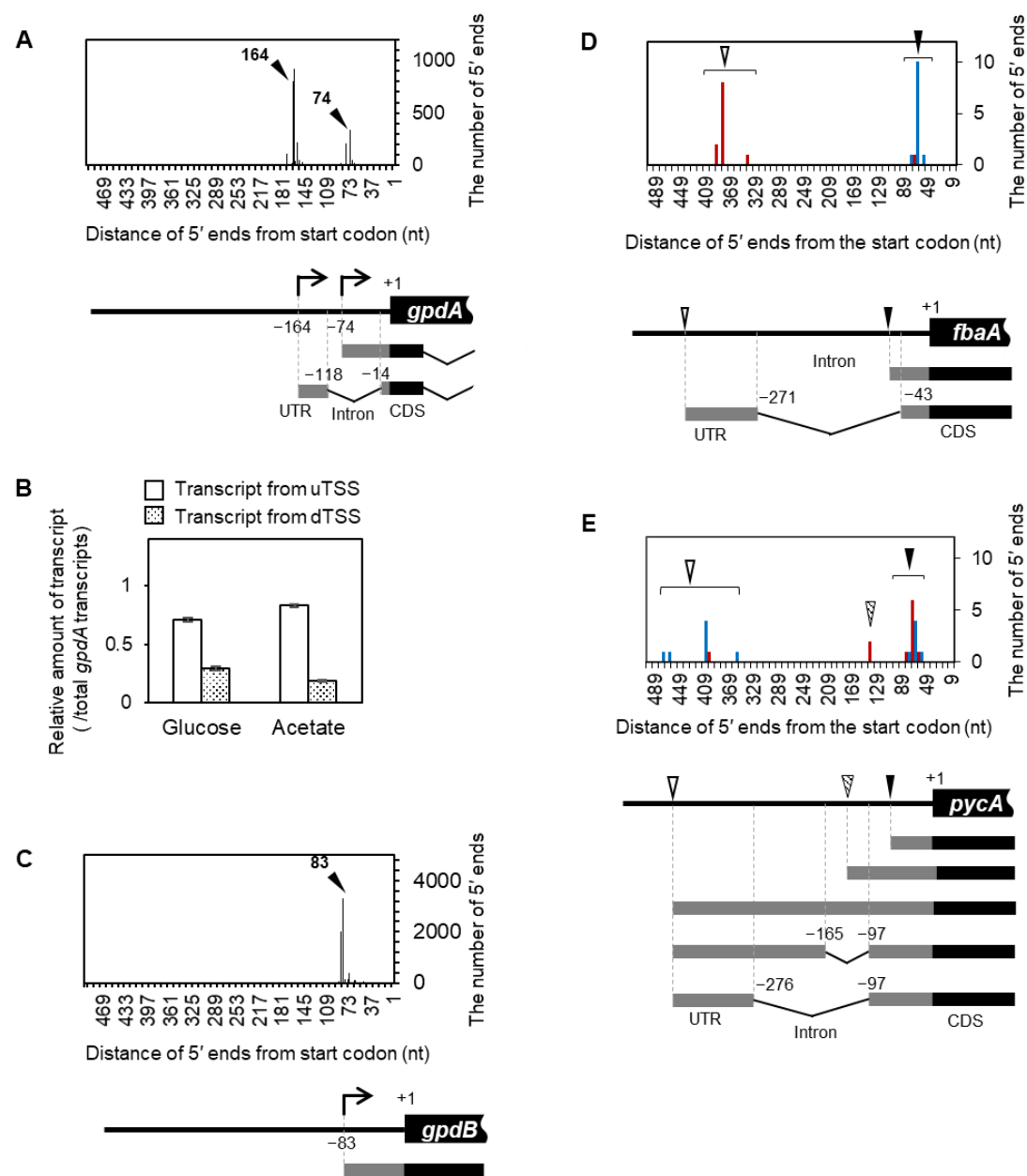
**b** Growth on agar plates with glucose or acetate. Conidia ( $10^3$ ) were grown on agar plate of MM containing 1 % glucose or 1 % sodium acetate for 4 days at 30°C. The *A. oryzae* strain harboring no mutations, mCS3 or 5' ssm in *enoA* promoter is shown as WT, mCS3 or 5' ssm, respectively.

**c** and **e** uTSS or dTSS-derived *enoA* transcript levels in WT and mCS3 strain (**c**) or 5' ssm strain (**e**) constructed by the strategy in Fig. 8A. Total RNA samples were prepared from mycelia grown in MM containing 1% casamino acids (**c**) or 2% glucose (**e**) for 36 h and then transferred to fresh MM containing 2% glucose or sodium acetate for 4 h. Values represent the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors. *P*-values were calculated by Student's *t*-test. \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$  versus uTSS- or dTSS-derived transcript in WT under each culture condition.

**d** and **f** Northern blot analysis on *enoA* in WT and mCS3 strain (**d**) or 5' ssm strain (**f**) constructed by the strategy in Fig. 8A. The same total RNA samples as ones in Fig. 8C or in Fig. 8E were used in (**d**) or (**f**), respectively.

**g** *enoA* RT-PCR analysis in WT or 5' ssm strain constructed by the strategy in Fig. 4a. The upstream Fw primer and Rv primer shown in Fig. 3A were used. Total RNA samples were prepared from mycelia grown in MM containing 2% glucose for 36 h and then transferred to fresh MM containing 2% sodium acetate for 4 h.





**Fig. 9 TSS characterization in additional glycolytic and gluconeogenic genes in *A. oryzae***

**a** Top panel: The number of *gpdA* 5' end clones obtained by 5' SAGE analysis as described in Fig. 1A. Numbers represent the distance of the 5' end peak (arrows). Bottom panel: Schematic representation of two *gpdA* TSSs. Numbers represent the positions of each TSS and the exon/intron junctions relative to the adenine nucleotide of the start codon (+1).

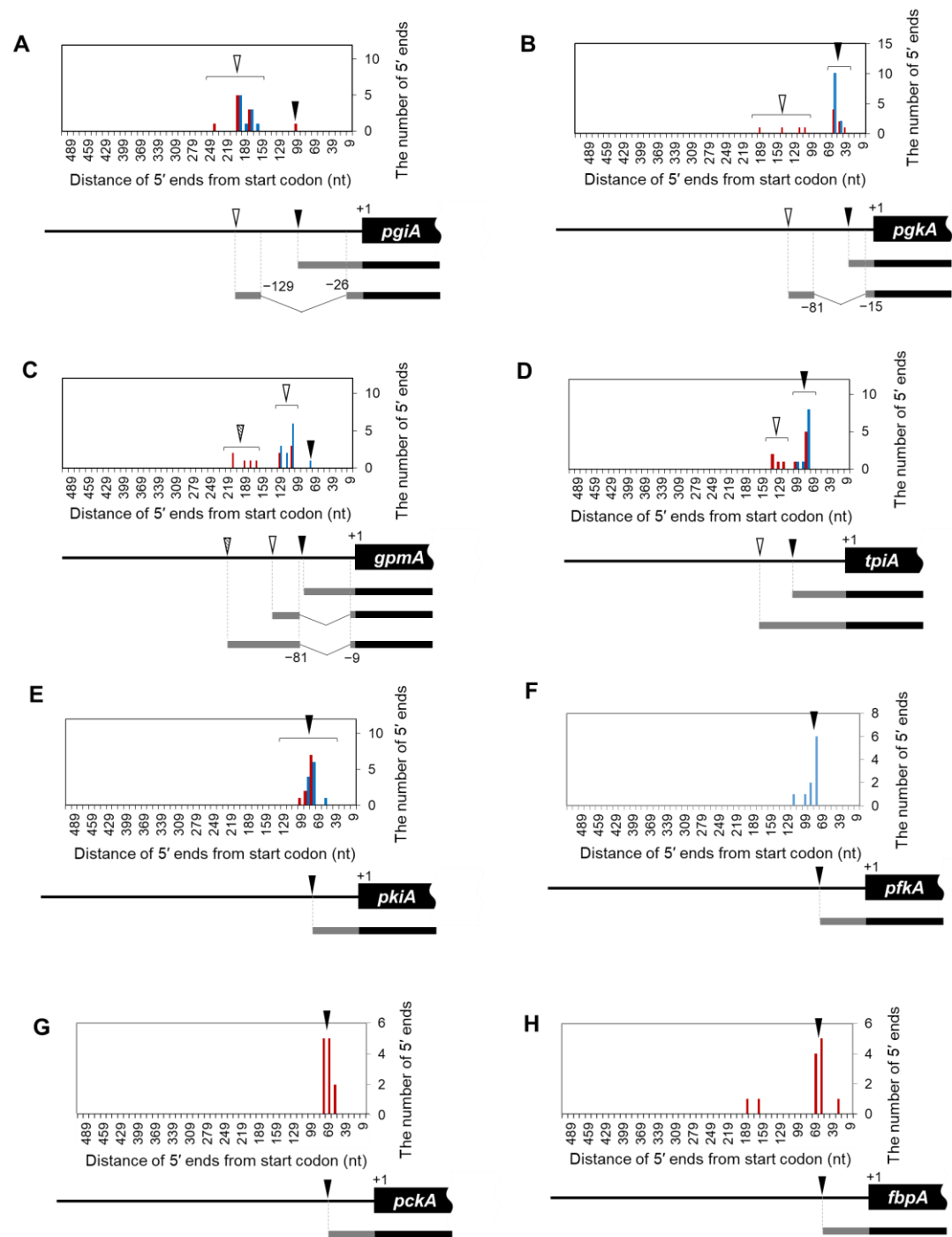
**b** uTSS or dTSS-derived *gpdA* transcript levels depending on the carbon source species. Primer sets were designed using the same strategy as in Fig. 1B. Total RNA samples were prepared from mycelia

grown in MM containing 2% glucose for 36 h or containing 2% sodium acetate for 72 h. Values represent the means of three independent experiments.

**c** Top panel: The number of *gpdB* 5' end clones obtained by 5' SAGE. Total RNA samples were prepared from mycelia grown in YPD submerged medium for 24 h or in wheat bran solid medium for 30 h. The two RNA samples were mixed and used for 5' SAGE analysis. A putative TSS deduced from the 5' end peak is indicated by an arrowhead. Bottom panel: Schematic representation of a *gpdB* 5' end transcript with a putative TSS.

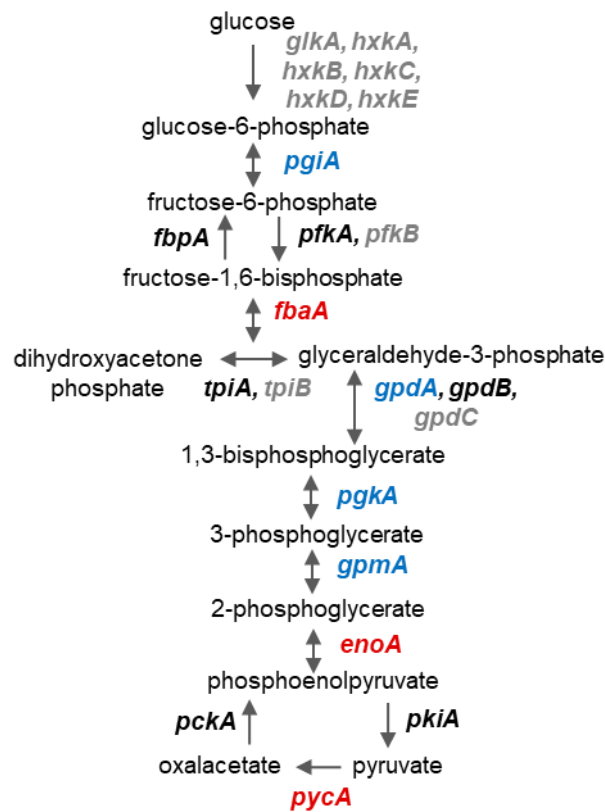
**d** Top panel: The number of *fbaA* 5' ends obtained by 5' RACE. Ten to twelve clones were obtained from each total RNA sample using RLM-RACE. All clones were sequenced. Total RNA samples were prepared from mycelia grown in MM containing 2% glucose for 36 h or containing 2% sodium acetate for 72 h. The clones of 5' ends obtained from samples in glucose and acetate culture conditions are shown in blue and in red, respectively. White and black arrowheads represent the uTSS and dTSS, respectively. Bottom panel: Schematic representation of 5' end transcripts obtained by 5' RACE. Numbers represent the locations of exon/intron junctions within the 5' UTR relative to the adenine nucleotide of the start codon (+1).

**e** Top panel: The number of *pycA* 5' ends obtained by 5' RACE as described in Fig. 3C. White and black arrowheads represent the uTSS and dTSS, respectively. Hatched arrowheads indicate an additional TSS within an intron in the 5' UTR. Bottom panel: Schematic representation of 5' end transcripts obtained by 5' RACE. Numbers represent the locations of exon/intron junctions within 5' UTR relative to the adenine nucleotide of the start codon (+1).



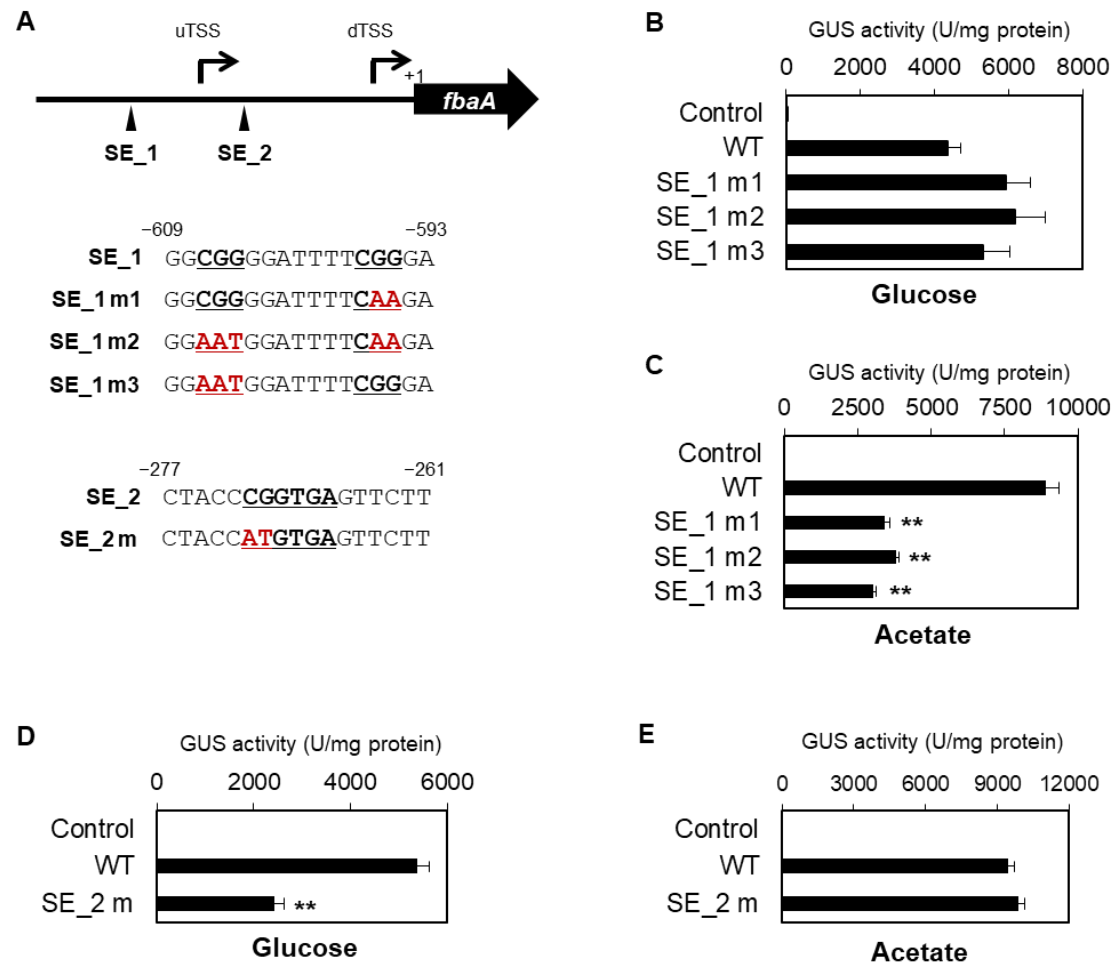
**Fig. 10 TSS characterization in additional glycolytic and gluconeogenic genes in *A. oryzae***  
**a-h** Top panels: The number of 5' ends of *pgiA*(a), *pgkA*(b), *gpmA*(c), *tpiA*(d), *pkiA*(e), *pfkA*(f), *pckA*(g) and *fbpA*(h) obtained by 5' RACE. Ten to twelve 5' end clones were obtained from each total RNA sample using RLM-RACE. All clones were sequenced. Total RNA samples were prepared from

mycelia grown in MM containing 2% glucose for 36 h or containing 2% sodium acetate for 72 h. The peak of 5' ends from glucose culture conditions is shown in blue and peaks from acetate culture conditions are shown in red. Because *pfkA* was not expressed in the presence of acetate and *pckA* and *fbpA* were not expressed in the presence of glucose, 5' RACE analysis was performed using cDNA prepared from mycelia grown in the presence of glucose (*pfkA*) or acetate (*fbpA* and *pckA*). Each arrowhead indicates a putative TSS and corresponds to the location in the 5' flanking region of the gene shown in the bottom panel. Bottom panels: Schematic representation of 5' end transcripts obtained by 5' RACE. Numbers represent the locations of exon/intron junctions relative to the adenine nucleotide of the start codon (+1).



**Fig. 11 Classification of the TSS types in *A. oryzae* glycolytic/gluconeogenic genes**

Manually-annotated genes involved in glycolysis and gluconeogenesis are bold italicized. Genes that possess alternative TSSs are shown in red. Genes that possess multiple TSSs are shown in blue. Genes possessing one TSS are shown in black. Genes that were not tested are shown in grey.



**Fig. 12 Similar elements to the putative cis-elements of *enoA* in *A. oryzae fbaA* promoter**

**a** Schematic representation of similar elements (SE) to putative cis-elements of *enoA* in the *A. oryzae fbaA* promoter and mutations used for the GUS reporter assay. SE sequence is shown in bold and underlined. The base substitution of mutations is shown in bold red.

**b-e** GUS activity of the transformants harboring GUS gene (*uidA*) expression constructs in glucose (**b** and **d**) or acetate (**c** and **e**) culture conditions. *uidA* was expressed by the *fbaA* promoter with or without mutations in the SE\_1 (**b** and **c**) or SE\_2 (**d** and **e**). Mycelia were grown in MM containing 2% glucose for 36 h or 2% sodium acetate for 72 h. Values are the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors. *P*-values were calculated by unpaired Student's *t*-test. \*\*: *P* < 0.01 versus WT.

## 第二章 転写開始点の比較解析から探る *Aspergillus* 属糸状菌間の解糖系酵素遺伝子群の転写制御における多様性

### 2-1 緒言

350 種以上が報告されている *Aspergillus* 属糸状菌は、最も多様性を示す真菌群の一つといわれており、その多様化の根底にある分子機構の解明は興味深い課題の一つである(1, 52)。以上の課題解決の一環として、一次代謝に関連する遺伝子群の多様性が比較ゲノミクスに基づき議論されている(21, 52)。一方、*Aspergillus* 属糸状菌が示す一次代謝に関連する多様性の例として、同一の炭素源種に対する資化能力に差が認められることが挙げられる。例えば、*A. oryzae* のグルコースに対する資化速度と生育速度は、モデル糸状菌である *A. nidulans* やクエン酸生産菌である *Aspergillus niger* に比べて高いことが知られている(53)。以上の違いは、*Aspergillus* 属糸状菌の炭素源代謝において最も根本的な違いの一つであり、産業的な糸状菌利用を考える上でも重要であるが、その違いに関連する分子メカニズムはほとんど検討されていない。

AP は、真核生物の転写段階における重要な環境応答機構であるが、動物や植物では種間において AP 内の TSSs 使用様式が多様化することが知られる(54-57)。例えば、ヒトやマウスでは、ほとんど全ての遺伝子に組織細胞種や発生段階の違いに応答する AP が認められるが(58)、半数以上の遺伝子において AP における TSSs 使用様式が 2 種間で異なることが報告されている(57)。そのため、AP 内の TSSs 使用様式の違いを異種間で検討することは、真核生物の転写制御における進化的変化を知る上で重要であると考えられる。多種多様な性質を示し、あらゆる分野で存在感を示す真菌類においても、AP の違いに基づいて遺伝子発現制御の多様性を探ることは重要であると思われる。しかし、真菌類では種間における AP の比較解析例自体が報告されていない。

第一章より、*A. oryzae* において、解糖と糖新生の両経路に関与するエノラーゼ遺伝子 *enoA* とフルクトースビスリン酸アルドラーゼ遺伝子 *fbaA* に、炭素源の違いによって使い分けられる 2 つの TSS からなる AP が存在することを示した。一方、*A. nidulans* では、酢酸資化能力が欠損した変異体の中からエノラーゼ遺伝子 *acuN* の 5' 側の上流領域-220 nt の位置において染色体転座変異を有する株が見出され、その株では非発酵性炭素源存在下における *acuN* 発現が低下することが示されている(17)。さらに、*A. nidulans* の *fbaA* オーソログ遺伝子に関しても類似の染色体転座変異を有する株が取得され、*acuN* の場合と同様の表現型を示すことが報告されている(59)。このような変異株の存在は、*A. nidulans* の *acuN* と *fbaA* に

における AP の存在を示唆しているが、それらの存在は直接的には証明されておらず、複数の TSSs の使用率を定量的に評価するための解析も行われていない。

以上の背景から、*Aspergillus* 属糸状菌の一次代謝と AP の多様性を検討する上で、解糖系酵素遺伝子の AP を近縁種間で比較することは重要であると考えられた。本章では、*Aspergillus* 属糸状菌間の解糖系酵素遺伝子群の AP における TSSs 使用法の保存性を調べるとともに、解糖系酵素遺伝子群における AP 多様化の意義に検討を加えた。

## 2-2 実験材料および方法

### 2-2-1 試薬

試薬類は、1-2-1 で記載した方法に従って使用した。

### 2-2-2 使用菌株

本研究で用いた糸状菌株は、Table 4 に示した。それぞれの糸状菌種の栄養要求性のない野生株として、*A. oryzae* RIB40 株 ((2), NRIB, Higashi-Hiroshima, Japan)、*A. nidulans* FGSCA4 株(60)、*Aspergillus luchuensis*  $\Delta ligD::ptrA$  株(61)、*Penicillium chrysogenum* Q176 株(62)、*Aspergillus flavus* RIB1406 株 (NRIB, Higashi-Hiroshima, Japan) を各種解析に用いた。*A. oryzae* の *enoA* プロモーター置換株を対象とした解析では、*PenoAWT\_rep* 株 (Table 1) をコントロールとして用いた。*A. nidulans* の *acuN* プロモーターによる *enoA* プロモーター置換株の構築には、 $\Delta ligD::ptrA\_niaD^+$  株 (Table 1) を親株として使用した。mCS3 変異が導入された *enoA* プロモーターによる *enoA* プロモーター置換株は、*PenoAmCS3\_rep* 株 (Table 1) を使用した。*A. oryzae* の形質転換に用いるプラスミド DNA の構築および増幅に用いる *E. coli* コンピレントセルの調製には、*E. coli* DH5 $\alpha$  (30)を使用した。

### 2-2-3 培地

培地は、1-2-3 で記載した組成に従って作製した。

### 2-2-4 分生子懸濁液の調製

分生子懸濁液の作製は 1-2-4 と同様の手順に従って行った。

### 2-2-5 菌体サンプルの回収

菌体サンプルの回収は、1-2-5 と同様の手順に従って行った。



#### 2-2-6 Total RNA の調製

Total RNA の調製は、1-2-6 に記載した ISOGEN (Nippon Gene) を用いた方法によって行った。CAGE 用の Total RNA に関しては、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いて調製した。RNeasy Plant Mini Kit で調製する場合、ISOGEN を用いる場合と同様に凍結破砕した菌体から RNA サンプルを調製した。その後の RNA 精製操作は、添付されたプロトコルに従って行った。CAGE に供する RNA サンプルは、BioAnalyzer2100 (Agilent)によって解析し、rRNA 由来の明瞭な 2 つのバンドピークが存在することと A260/280、260/230 の値がそれぞれ 1.7 以上であることを確認した。

#### 2-2-7 cDNA 合成

cDNA の合成は、1-2-7 と同様の手順に従って行った。

#### 2-2-8 qRT-PCR

qRT-PCR 実験は、1-2-8 に記載した方法に従って行った。本章で qRT-PCR に用いたプライマーは Table 5 に示した。

#### 2-2-9 ノーザンブロット

ノーザンブロット解析は、1-2-10 に記載した方法に従って行った。本章でプローブ合成に用いたプライマーは Table 5 に示した。

#### 2-2-10 5' RACE

5' RACE 解析は、1-2-11 に記載した方法に従って行った。本章で 5' RACE 解析に用いたプライマーは、Table 5 に示した。

#### 2-2-11 DNA シークエンシング解析による塩基配列の決定

DNA シークエンシング解析は、1-2-12 に記載した方法に従って行った。

#### 2-2-12 大腸菌の形質転換およびプラスミド DNA の増幅、回収

大腸菌のコンピテントセル作製および形質転換操作は 1-2-13 に記載した方法に従って行った。

#### 2-2-13 *enoA* プロモーター置換に用いる DNA 断片の構築

*A. oryzae* の染色体上の *enoA* プロモーターを *A. nidulans* 由来の *acuN* プロモーターで置換するために用いた DNA 断片は、以下の手順で構築した。pCPemCS3R (Table 2) と up-PenoA-if\_Fw + AnsC\_Rv を用いた PCR によって *enoA* プロモーターの上流領域と *sC* マーカーを含む DNA 断片、*A. nidulans* FGSCA4 株のゲノム DNA と PacuN-if\_Fw + PacuN\_Rv を用いた

PCR によって *acuN* プロモーターの DNA 断片、*A. oryzae* RIB40 株のゲノム DNA と PacuN-*enoACDS-if\_Fw* + *CDS-enoA-if\_Rv* を用いた PCR によって *enoA* の CDS 領域の DNA 断片をそれぞれ合成した。以上の 3 断片を、In fusion HD Cloning Kit (Takara Bio USA) を用いて直鎖状 pUC19 ベクターに同時に挿入し、pCPacuNR を得た。そして、pCPacuNR と up-PenoA-if\_Fw + *CDS-enoA-if\_Rv* を用いた PCR によって合成した DNA 断片を形質転換に用いた。

#### 2-2-14 *A. oryzae* の形質転換

*A. oryzae* の形質転換は、1-2-18 に記載した方法に従って行った。

#### 2-2-15 サザンブロット解析

*A. oryzae* 株におけるプロモーター置換をサザンブロットにより確認した (データ省略)。ゲノム DNA の調製とサザンブロットの操作は、田中らが記載した方法(35)に従って行った。*acuN* プロモーターによる *enoA* プロモーター置換株のゲノム DNA を *SpeI* で処理し、RIB40 株のゲノム DNA と *enoA-CDS\_Fw* + *CDS-enoA-if\_Rv* のプライマーを用いた PCR で調製した検出用プローブによって解析し、ホモカリオンであることを確認した。

#### 2-2-16 Cap Analysis of Gene Expression (CAGE)

*A. oryzae* RIB40 または *A. nidulans* FGSCA4 の分生子  $1.0 \times 10^7$  個を 2% グルコースを含む最少液体培地にそれぞれ植菌し、30°C、120 rpm の条件で 36 時間前培養した。その後、得られた菌体を、2% グルコースまたは酢酸ナトリウムを含む新鮮な最少液体培地に移して、30°C、120 rpm の条件で 4 時間インキュベートした。以上の条件によって得られた菌体から RNA サンプルを調製し、その後の CAGE に供した。*A. oryzae* と *A. nidulans* の各培養条件で CAGE に関するデータを 2 連ずつ取得した。

CAGE は、株式会社ダナフォームに解析を外注した。CAGE ライブラリーは、no-amplification non-tagging CAGE (nAnT-iCAGE) 法(63)によって調製した。nAnT-iCAGE 法では、5' cap 構造が特異的にビオチン化修飾された mRNA 分子をストレプトアビジンビーズで免疫沈降することで網羅的に 5' 末端配列リードを濃縮する手法である。nAnT-iCAGE 法で調製された CAGE ライブラリーは、PCR 工程を経ずに次世代シーケンサーでシーケンシングされるため、定量性の高い発現量情報を得ることができる。それぞれの RNA サンプル毎に調製した CAGE ライブラリーは、HiSeq または NextSeq (illumina) でシーケンシングした。それによって得られたリードデータを含む Fastq ファイルは、fastqc プログラ

ムによってクオリティを確認した。5' 末端配列リードデータは、まず BWA プログラムを用いてリファレンスゲノムにマッピングし、BWA によってマッピングされなかったリード配列はさらに HISAT2 プログラムによってマッピングした (Table 6)。リファレンスゲノムには、Aspergillus Genome Database (<http://www.aspergillusgenome.org/>) に登録されている *A. oryzae* RIB40 と *A. nidulans* FGSCA4 のゲノム配列を用いた。マッピングされたリード配列データは、CAGE による TSS 解析用にデザインされたパイプライン RECLU (64) によって処理した。RECLU によるデータ処理により、マッピングされたリード配列の集合を TSS としてクラスタリングし、それぞれの TSS におけるリード数に基づいて TSS 毎の発現量情報を算出した。その一方、リファレンスデータに登録されている遺伝子の 5' 末端の上流および下流 500 bp 内に位置することを条件に、クラスタリングした TSS に対して、遺伝子を自動的にアノテーションした。その後、アノテーションされた TSS の発現量情報を基に、遺伝子毎の発現量情報が算出した。TSS 毎または遺伝子毎の発現量は、百万リードに対するリード数 (Count per Million: CPM) で示した。本解析の CAGE データを利用した発現量解析には、2 連ずつ取得された発現量値の平均を用いた。

#### 2-2-17 CAGE データの比較解析対象とする一次代謝遺伝子群の選抜

Flipphi らによる一次代謝関連遺伝子のアノテーション結果(21)を基に、*A. oryzae* と *A. nidulans* の一次代謝 (解糖系/糖新生、ピルビン酸代謝、tricarboxylic acid (TCA) /グリオキシル酸回路、ペントースリン酸回路) に関連する 79、75 酵素遺伝子のうち、互いにオーソログな関係にある 71 遺伝子をそれぞれの種で選抜した。これらの遺伝子について、開始コドン周辺の主要な TSS が確実にアノテーションされているかを Integrative genomics viewer (IGV) ツール (65) を利用して確認した。その際、AO090009000634(*alcA*)、AO090011000486(*lpdA*)、AO090003000725(*fbaA*)の開始コドン上流領域付近の TSS におけるアノテーションミスが認められたため、マニュアルで適宜修正した。その後、*A. oryzae* と *A. nidulans* の全遺伝子の発現量の四分位数を求め (Table 7)、その結果を基に両種においてグルコース培養条件または酢酸培養条件のいずれかの条件で発現量が上位 25%以内に含まれない遺伝子を決定し、解析対象から除外した。ただし、TSSs のアノテーションが不正確であった AO090009000634(*alcA*)、AO090011000486(*lpdA*)、AO090003000725(*fbaA*)は、アノテーションの修正によって新たに追加された TSS の発現量が、他の解析対象とした遺伝子と同程度の値を示していたため、解析対象遺伝子とした。以上の基準で最終的に選抜された *A. oryzae* と *A. nidulans* の 59 遺伝子を、最終的に CAGE データの比較解析対象とした。

#### 2-2-18 乾燥菌体重量の測定

乾燥菌体重量は、液体培養して得た菌体を Miracloth による濾過で分離し、キムタオルで脱水後、凍結乾燥機で乾燥させた後、電子天秤で計量した。

#### 2-2-19 High-performance liquid chromatography (HPLC) による培養上清中の炭素源濃度の測定

培養液中のグルコースまたは酢酸濃度は、HPLC によって測定した。菌体培養後の培養液から、分画分子量 1 万のセントリカット超ミニ(Kurabo Industries Ltd., Osaka, Japan)と Millex LG 0.2  $\mu$ m filters (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)によってタンパク質などの夾雑物を除去し、HPLC に供した。HPLC は、CCP & 8020 system (Tosoh Corp., Tokyo, Japan)と Aminex HPX-87H HPLC columns (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)を用いて行った。HPLC のデータは、C-R8A Chromatopac Data Processor (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan)によって解析した。

**Table 4. Fungal strain used in the chapter 2**

Strain (Genotype)	Reference
<i>A. oryzae</i> RIB40	Machida et al., 2005
<i>A. nidulans</i> FGSCA4	Galagan et al., 2005
<i>A. luchuensis</i> $\Delta ligD::ptrA$	Takahashi et al., 2011
<i>A. flavus</i> RIB1406	NRIB から分譲
<i>P. chrysogenum</i> Q176	Raper, 1946
$\Delta ligD::ptrA\_niaD^+$ (sC <sup>-</sup> )	第一章
PenoAWT_rep	第一章
PacuN_rep	This study
PenoAmCS3_rep	第一章

**Table 5. Primers used in the chapter 2**

Primer	Sequence (5' $\rightarrow$ 3')	Usage
Oligo dT primer	TTTTTTTTTTTTTTTTT	cDNA synthesis
acuN-Up_Fw	CTCCCGTCCGTCCAAAG	qRT-PCR
acuN-Down_Fw	CTCCTTTCTGACTCTATCCTTCTAGTTCATCAA	
acuN-	GGGTTACCACGAGATCGTAG	

Up/Down_Rv		
acuN-CDS_Fw	ATCCACGCCCCGCTCAGTCTA	
acuN-CDS_Rv	GAAGACCGGTCTCGGTGACA	
enoA-Up_Fw	AGTCTACTAGTAACTCTGTCTTATCGTCATCTC	
enoA-Up_Rv	CGCGGGAGTCGTAAACAGA	
enoA-Down_Fw	CAAGTTAGTCGACTGACCAATTCC	
enoA-Down_Rv	CCGCGGGAGTCGTAAACA	
enoA-CDS_Fw	TCCACGCCCCGCTCTGTTTAC	
enoA-CDS_Rv	GCAAACCAGTCTCGGTGACA	
enoA-NP_Fw	TCCACGCCCCGCTCTGTTTAC	Probe synthesis for northern blot
enoA-NP_Rv	GGTTGACAGAAGTGCGGAAC	
acuN-NP_Fw	ATCCACGCCCCGCTCAGTCTA	
acuN-NP_Rv	CAGGTTAACAGACTTGCGGAAGT	
AlenoA-NP_Fw	TCCATCAACATGCCTATCTCCAAGA	
AlenoA-NP_Rv	GTTAACGGCAGTGCGGAAC	
acuN_GSP1	GACGTTGCCAGCAGACTGGCCGTACTTC	5' RACE
acuN_GSP2	CACCCTGGCGGAGACCCTCGGAGAAAG	
AlenoA_GSP1	GAACCACCGTTTCAGGACGTTCTG	
AlenoA_GSP2	GAGCTTGTTGAGGAACTCATCA	
PcenoA_GSP1	CAAGGTCGGAGATGTGAGCGTAGAG	
PcenoA_GSP2	GCGTTGGCACCGAGCTTG	
up-PenoA-if_Fw	CGGTACCCGGGGATCCACTTCTCGTAACTCTCGGATTTG	Promoter replacement
AnsC_Rv	GCTTCTCTTGGAATAGCTGCCCCG	
PacuN-if_Fw	ATTGCCAAGAGAAGCCAATATAGCCATGTTCAAGC	
PacuN_Rv	CATTTTGATGAACTAGAAGGATAGAG	
PacuN-enoACDS-if_Fw	TAGTTCATCAAAATGCCTATCACCAAGATCCAC	
CDS-enoA-if_Rv	CGACTCTAGAGGATCGCTGTGCGGGGTTCTTGAAG	

## 2-3 結果

### 2-3-1 *A. oryzae* の近縁種間でのエノラーゼ遺伝子における TSSs の解析

*A. oryzae* における *enoA* の発酵性炭素源と非発酵性炭素源の違いに応答した AP が近縁種間で保存されているかどうか検討するため、*A. oryzae* の近縁種におけるエノラーゼ遺伝子

の TSSs を解析した。*A. nidulnas* FGSCA4 株のエノラーゼ遺伝子 *acuN* において、グルコースまたは酢酸培養条件下における 5' RACE 解析を行った結果、-440 nt と -20 nt 付近に 2 つの TSS (uTSS、dTSS) の存在が示唆され、さらに uTSS 由来の 5' UTR 内には 385 bp のイントロンが確認された (Fig. 13A)。酢酸条件では uTSS、dTSS 由来の 5' 末端配列クローンがそれぞれ 11、1 クローンずつ検出され、グルコース条件では uTSS と dTSS 由来の 5' 末端配列クローンは 9、3 クローンずつ検出された (Fig. 13A)。このことから、グルコース存在下における *acuN* の TSSs 使用パターンは、*enoA* のものとは異なることが示唆された。実際に、qRT-PCR によって各種炭素源存在下における *acuN* の 2 つの TSS の使用率を推定したところ、酢酸やエタノール存在下で *enoA* の場合と同様に uTSS の優先的な使用が示唆された一方、グルコースやフルクトース存在下では *enoA* の場合と異なり dTSS の顕著な優先的使用は認められなかった (Fig. 13B)。さらに、各種炭素源存在下における *acuN* のノーザンブロット解析を行った結果、酢酸やエタノール存在下の *acuN* 転写産物量はグルコースやフルクトース存在下よりも高い傾向にあることが示唆された (Fig. 13C)。以上の結果より、エノラーゼ遺伝子における AP の TSSs 使用様式と発現量調節様式は、*A. oryzae* と *A. nidulans* 間で異なることが示唆された (Fig. 13D)。

エノラーゼ遺伝子の AP の多様性に関するさらなる知見を得るため、ゲノム配列の違いに基づいて推定された *Aspergillus* 属糸状菌類の系統樹(1)において、*A. oryzae* と *A. nidulans* の間に位置すると推定される *A. luchuensis*、*Aspergillus* 属と近縁な *Penicillium* 属に属し、*A. nidulans* と比較的近い系統関係にあると推定される *P. chrysogenum*、および *A. oryzae* と非常に近い系統関係にあると推定される *Aspergillus flavus* の 3 種について、それぞれのエノラーゼ遺伝子の TSSs 使用様式を簡易的に調べた。*A. luchuensis*  $\Delta ligD::ptrA$  株を各種炭素源を含む寒天プレート上で生育させたところ、酢酸培地で顕著な生育不良が認められた (データ省略)。各種炭素源存在下における *A. luchuensis* のエノラーゼ遺伝子 *AlenoA* の転写産物をノーザンブロットで解析したところ、グルコースやエタノール存在条件下で *AlenoA* 転写産物の存在が認められた一方、酢酸条件においては *AlenoA* 転写産物がほとんど検出されなかった (Fig. 14A)。以上の結果から、*A. luchuensis* では酢酸存在下で *AlenoA* の著しい転写抑制が起こっていることが考えられたため、グルコースまたはエタノール存在下における 5' RACE 解析を行うことで *AlenoA* における AP の TSSs 使用様式を調べた。5' RACE の結果、*AlenoA* において -650 nt と -40 nt 付近に 2 つの TSS (uTSS、dTSS) の存在が示唆され、uTSS 由来の転写産物における 5' UTR 内に 586 bp のイントロンが確認された (Fig. 14B)。エタノール存在下では uTSS 由来の 5' 末端配列クローンのみが取得され、グルコース存在下では uTSS

と dTSS 由来の 5' 末端配列クローンがそれぞれ 6 クローンずつ取得された (Fig. 14B)。以上の結果から、*AlenoA* は *enoA* と *acuN* の中間的な TSSs 使用様式を有することが考えられた。*P. chrysogenum* Q176 株のエノラーゼ遺伝子 *PcenoA* において、グルコースまたは酢酸培養条件下における 5' RACE 解析を行った結果、-390 nt と -25 nt 付近に 2 つの TSS (uTSS、dTSS) の存在が示唆され、uTSS 由来の 5' UTR 内に 355 bp のイントロンが確認された (Fig. 14C)。*PcenoA* において、酢酸条件では uTSS 由来の 5' 末端配列クローンのみが取得され、グルコース条件では uTSS、dTSS 由来の 5' 末端配列クローンがそれぞれ 10、2 クローンずつ検出された (Fig. 14C)。この結果から、*PcenoA* は *acuN* と類似した TSSs 使用様式を有することが考えられた。*A. flavus* のエノラーゼ遺伝子 *AfenoA* の CDS 配列と開始コドン上流 1000 bp の配列は、*A. oryzae* の *enoA* のものとほぼ完全に一致しており、*enoA* の TSSs 付近と開始コドン付近の CDS 領域において配列に違いは認められなかった。そこで、*enoA* における TSSs 使用率の推定のために行った qRT-PCR 実験 (第一章、Fig. 3A) と同様の実験を、*A. flavus* RIB1406 株を用いて行った。その結果、グルコースおよび酢酸培養条件下において、dTSS と uTSS、それぞれの TSS の優先的使用を示唆するデータが得られた (Fig. 14D)。このことから、*AfenoA* は *enoA* と類似した TSSs 使用様式を有する可能性が高いと考えられた。以上の結果から、本研究で解析対象とした糸状菌類の近縁関係とエノラーゼ遺伝子における AP の多様化様式は、ある程度相関する可能性が考えられた。

### 2-3-2 *acuN* プロモーターによるプロモーター置換が *A. oryzae* の *enoA* 発現に及ぼす影響の解析

*A. oryzae* と *A. nidulans* 間のエノラーゼ遺伝子の AP における TSSs 使用様式の変化がプロモーター配列の違いによるものかどうかを調べるため、染色体上の *enoA* プロモーターを *A. nidulans* の *acuN* プロモーターに置換した *A. oryzae* 株 (*PacuN rep* 株) を作製し (Fig. 15A)、*PacuN rep* 株の表現型と *enoA* 転写産物を解析した。*PacuN rep* 株のグルコースまたは酢酸を含む寒天プレート上における生育を観察したところ、野生株と比較して顕著な生育の変化は見られなかった (Fig. 15B)。qRT-PCR により、*PacuN rep* 株における *enoA* の 2 つの TSS 使用率をグルコースおよび酢酸培養条件下で検討した結果、両培養条件下において顕著な TSSs 使用様式の変化は認められなかった (Fig. 15C)。また、グルコースまたは酢酸培養条件下における *enoA* の総転写産物量比においても、*PacuN rep* 株と野生株間で有意な差は認められなかった (Fig. 15D)。以上より、2 種間におけるエノラーゼ遺伝子の AP における TSSs 使用様式の変化には、種間におけるプロモーター配列の変化とは異なる分子機構が関与するこ

とが考えられた。

### 2-3-3 *A. oryzae* と *A. nidulans* における 5' CAGE データの特徴

これまでの解析結果から、*Aspergillus* 属糸状菌類のエノラーゼ遺伝子における AP の TSSs 使用様式は種によって異なることが示唆されたが、少なくとも *A. oryzae* においては、AP による転写制御は発酵性炭素源存在下における発現量を増加させるように変化したと思われる (Fig. 13D)。また、第一章より、*A. oryzae* における dTSS 由来の *enoA* 発現の抑制は、グルコース存在下における生育遅延に繋がることが示されている (Fig. 8A-D)。このことから、エノラーゼ遺伝子の AP の多様化は、各糸状菌種の一次代謝特性とそれを介した細胞生理に影響を及ぼしている可能性が考えられた。このエノラーゼ遺伝子のような AP の多様化の有無を包括的に検討するため、*A. oryzae* と *A. nidulans* において、CAGE 法によるゲノム網羅的な TSS 情報と TSS 毎の転写産物量情報を、グルコースおよび酢酸培養条件下でそれぞれ取得した。本解析では、4 種類のサンプル条件について CAGE データを 2 連で取得した。

CAGE では、75 bp 程度の mRNA の 5' 末端配列リードのライブラリーを、次世代シーケンサーによって解析することで、TSS と TSS 毎の発現量の情報がゲノム網羅的に取得できる。fastqc プログラムにより、次世代シーケンサーによって得られたシーケンスデータのクオリティ (決定された各リードの塩基配列の信頼性、リード長の分布傾向、リードにおける塩基配列の分布傾向) を確認した結果、解析に供した全サンプルにおいて CAGE の原理に矛盾するデータ特徴は認められず、信頼性の高いリードデータが取得されたことが示唆された (データ省略)。各サンプル条件において取得されたリード総数に対して、以後の解析に用いる上で信頼性を有する精度でゲノムマッピングされたリード数の割合は、*A. oryzae* のグルコース条件で  $80.0 \pm 0.4 \%$ 、*A. oryzae* の酢酸条件で  $77.2 \pm 0.4 \%$ 、*A. nidulans* のグルコース条件で  $50.4 \pm 2.4 \%$ 、*A. nidulans* の酢酸条件で  $58.5 \pm 0.2 \%$  となり (Table 6 の Totally used におけるリード数から算出した)、*A. nidulans* のマッピング率は *A. oryzae* より低い傾向にあった。CAGE において、発現量はリード総数に対する任意のリード数の割合から、百万リード当たりのリード数 (Count per Million: CPM) に正規化された値で算出されるため、*A. nidulans* における発現量情報は、*A. oryzae* に比べてある程度高く見積もられる可能性が示唆された。

マッピングされたリードは、TSS 解析用にデザインされた RECLU パイプラインによって処理される過程で、TSS としてクラスタリングされる。2 種間におけるリードのマッピング率の違いが TSS の数に影響を及ぼしたかどうか検討する目的で、グルコース条件と酢酸条件のリードデータから推定された TSS の数をカウントした。その結果、TSS 数は *A. oryzae* で 33660、*A. nidulans* で 40406 となり、マッピング率が高かった *A. oryzae* においてむしろ TSS 数が少ない傾向が見られた。このことから、マッピング率の違いと推定 TSS 数の違い



に相関性はないことが考えられた。また、クラスタリングされた TSSs のうち、データベースに登録されている遺伝子によってアノテーションされた TSS の割合は、*A. oryzae* で 65.1 % (21925 / 33660)、*A. nidulans* で 69.9 % (28240 / 40406)であり、以上の値においても 2 種間でマッピング率の違い程の大きな差は認められなかった。TSS にアノテーションされた遺伝子の数は、*A. oryzae* においては全 12364 遺伝子中 8284 遺伝子、*A. nidulans* においては全 10998 遺伝子中 8635 遺伝子であり、発現していると推定される遺伝子の数においても、マッピング率の違いが原因と推定される 2 種間の違いは見られなかった。さらに、遺伝子でアノテーションされた TSS を構成するリード総数をカウントし、取得された全リード数に占める割合を各サンプル条件でそれぞれ算出したところ、*A. oryzae* のグルコース条件では  $41.3 \pm 1.3$  %、*A. oryzae* の酢酸条件では  $37.7 \pm 0.3$  %、*A. nidulans* のグルコース条件では  $41.3 \pm 2.5$  %、*A. nidulans* の酢酸条件では  $49.0 \pm 0.3$  %であった。マッピング率の低い *A. nidulans* において、*A. oryzae* の値と同程度以上の値が算出されたことから、マッピング率の違いが既知遺伝子の TSS 情報に影響している可能性は低いことが考えられた。

#### 2-3-4 5' CAGE データに基づく *A. oryzae* と *A. nidulans* 間の一次代謝酵素遺伝子群における発現様式の比較解析

*A. oryzae* と *A. nidulans* 間のエノラーゼ遺伝子の AP における TSSs 使用様式の違いは、グルコース条件と酢酸条件における転写産物量比に影響を及ぼしていることが考えられた (Fig. 13D)。そこで、どの程度の遺伝子が上述した *enoA* のような発現量比の違いを示すのか調べるため、*A. oryzae* と *A. nidulans* それぞれの種においてオーソログな関係にある遺伝子の、酢酸条件の発現量に対するグルコース条件の発現量の比 (Ratio of transcript level: RTL) の差 ( $\Delta RTL$ ) を、2 種間における転写産物量比の多様化指数として定義した (Fig. 16A)。そして、 $\Delta RTL$  値に基づき、一次代謝に関連するオーソログ遺伝子を 3 つのグループに分類した。本解析では、 $\Delta RTL \geq 1$  の場合 *A. oryzae* において *A. nidulans* よりもグルコース条件下で高発現する傾向を示す遺伝子群 (G1)、 $\Delta RTL \leq -1$  の場合 *A. oryzae* において *A. nidulans* よりも酢酸条件下で高発現する傾向を示す遺伝子群 (G2)、 $-1 < \Delta RTL < 1$  の場合 2 種間で類似した発現量比パターンを示す遺伝子群 (G3) として分類した (Fig. 16B)。解析対象とした遺伝子は、解糖系/糖新生、ピルビン酸代謝、ペントースリン酸回路、TCA/グリオキシル酸回路のいずれかの代謝系に関与すること、*A. oryzae* と *A. nidulans* 同士でオーソログが存在すること、2 種のうち少なくとも片方の種においてグルコースまたは酢酸条件下で発現量が発現遺伝子の中で上位 25%以内に入ること (高発現していること) の 3 つの基準を全て満たすことを条件に選抜し、結果的に *A. oryzae* と *A. nidulans* の 59 遺伝子が解析対象とした (Fig. 16B)。以上の解析対象遺伝子を  $\Delta RTL$  値に基づいて分類した結果、G1 には 17 遺伝子 (17/59,

29%)、G2 には 10 遺伝子 (10/59, 17%)、G3 には 32 遺伝子 (32 / 59, 54%) がそれぞれ分類され、約半数の遺伝子が G1、G2 のグループに分類される結果となった (Table 8)。注目すべきことに、G1 には解糖/糖新生に関連する 12 遺伝子が含まれており (12/17, 71%)、グループ内の全遺伝子に占める割合が高かった (Table 8)。G1 に含まれていた解糖/糖新生に関連する 12 遺伝子は全て解糖経路に関与するものであり、その中には *enoA* や *fbaA* のような可逆反応を触媒する酵素の遺伝子や、ホスホフルクトキナーゼ遺伝子 *pfkA* やピルビン酸キナーゼ遺伝子 *pkiA* のような解糖経路において不可逆反応を触媒する酵素の遺伝子が含まれていた (Fig. 16C)。以上の結果から、*A. oryzae* の解糖経路に関与する酵素遺伝子群は、*A. nidulans* と比べてグルコース条件でより高発現する傾向があることが示唆された。

#### 2-3-5 5' CAGE データに基づく *A. oryzae* と *A. nidulans* 間の一次代謝酵素遺伝子群における TSSs 使用様式の比較

解析対象となった 59 遺伝子のうち、*A. oryzae* の *enoA* と *A. nidulans* の *acuN* において、CAGE データに基づく TSSs 情報を参照したところ、両遺伝子において 5' SAGE や 5' RACE の結果から予測されたものと同じ 2 つの TSS (uTSS、dTSS) が認められた (Fig. 17A)。*enoA* においては、グルコース条件における dTSS の優先的な使用と酢酸条件における uTSS の優先的な使用が認められ、第一章の qRT-PCR とノーザンブロットの結果によって示されていた TSSs 使用様式 (Fig. 13D) の傾向と一致した。一方 *acuN* では、グルコース条件において dTSS 使用率が uTSS 使用率より 2.6 倍高い値を示しており (Fig. 17B)、qRT-PCR による TSSs 使用率の推定結果 (Fig. 13B) とは異なる傾向を示した。また、酢酸条件では uTSS の優先的な使用が認められたものの、dTSS 使用率が uTSS 使用率の 0.35 倍のレベルで認められ (Fig. 17B)、酢酸条件においても qRT-PCR による TSSs 使用率の推定結果 (Fig. 13B) とは異なる傾向が示された。しかしながら、*acuN* では、*enoA* に匹敵するほどの dTSS のグルコース条件における使用頻度の増加は認められなかった (Fig. 17A, B)。また、全転写産物量においても、グルコース条件特異的な *acuN* の高発現は認められない (Fig. 17B)。そのため、グルコース条件における *acuN* の dTSS 由来の転写誘導は、*enoA* ほど高レベルではないことが改めて考えられた。以上より、CAGE データにおいても、*enoA* と *acuN* 間における AP の TSSs 使用様式の違いと発現量様式の違いが示された。エノラーゼ遺伝子以外の他の一次代謝酵素遺伝子においても CAGE データに基づく TSSs 情報を 2 種間で比較したところ、少なくとも Table 9 に示した 6 遺伝子において複数 TSSs の使用様式の違いが認められた。

上述の 6 遺伝子のうち、解糖経路に関連する遺伝子はフルクトースビスリン酸アルドラ

ーゼ (FBA) 遺伝子、ホスホフルクトキナーゼ-1 (PFK-1) 遺伝子、ピルビン酸キナーゼ (PK) 遺伝子、ホスホフルクトキナーゼ-2 (PFK-2) 遺伝子の 4 つが含まれていた。CAGE データより、*A. oryzae* の FBA 遺伝子 *fbaA* と *A. nidulans* の *fbaA* オーソログ遺伝子 *AnfbaA* においては、2 つの TSSs (uTSS、dTSS) の存在が認められた (Fig. 18A, B)。 *fbaA* においては、グルコース条件における dTSS の優先的な使用と酢酸条件における uTSS の優先的な使用が認められ (Fig. 18A)、この TSSs 使用様式の傾向は第一章の 5' RACE によって示されたものと一致した (Fig. 9D)。また、グルコース条件における dTSS 由来の *fbaA* 転写産物量は酢酸条件における uTSS 由来のものより高いレベルを示した (Fig. 18A)。 *AnfbaA* においても、*fbaA* と同様に酢酸条件優先的な uTSS 使用とグルコース条件における dTSS の優先的な使用が認められたが、dTSS 由来の *AnfbaA* 発現量はグルコース条件と酢酸条件間で同程度のレベルを示し、*fbaA* のようなグルコース誘導的な dTSS からの高発現は認められなかった (Fig. 18B)。 CAGE データを取得した培養条件と同様の条件下において、*AnfbaA* に関する 5' RACE 解析を行ったところ、CAGE の結果と類似した TSSs 使用様式の傾向が示され、さらにデータベース上には登録されていなかった uTSS 由来の転写産物の 5' UTR 内における 136 bp のイントロン配列が確認された (Fig. 18C)。一方、PFK-1 遺伝子、PK 遺伝子、PFK-2 遺伝子では、TSSs の数自体が 2 種間で異なることが示唆された (Fig. 19-21)。 *A. oryzae* の PFK-1 遺伝子 *pfkA* では、グルコース条件で使用頻度が増加する TSS-1 とグルコースと酢酸の両条件下で低頻度で構成的に用いられる TSS-2 の存在が示唆され (Fig. 19A)、 *A. nidulans* の PFK-1 遺伝子 *AnpfkA* では、酢酸条件での使用頻度の増加がみられるものの、グルコース条件においても高頻度で使用される一つの TSS の存在が示唆された (Fig. 19B)。 *A. oryzae* の PK 遺伝子 *pkiA* では、グルコース条件で使用頻度が増加する一つの TSS の存在が示唆され (Fig. 20A)、 *A. nidulans* の PK 遺伝子 *AnpkiA* では、グルコースと酢酸条件である程度構成的な使用頻度を示す 2 つの TSSs の存在が示唆された (Fig. 20B)。 *pfkA* と *pkiA* では、*AnpfkA* や *AnpkiA* と比べて、結果的に酢酸条件よりグルコース条件で高発現する傾向を示した (Fig. 19, 20)。 *A. oryzae* の PFK-2 遺伝子 *pfkZ* では、グルコースと酢酸の両条件下で構成的に使用される一つの TSS の存在が示唆され (Fig. 21A)、 *A. nidulans* の PFK-2 遺伝子 *AnpfkZ* では、グルコースと酢酸の両条件下で構成的に使用される TSS-1 と、酢酸条件で使用頻度が増加する TSS-2 の存在が示唆された (Fig. 21B)。 *pfkZ* は *AnpfkZ* と比べて、酢酸条件よりグルコース条件で高発現する傾向を示していたが (Fig. 21A, B)、 *pfkZ* の TSS における CPM 値は 10–25 と他の *A. oryzae* の一次代謝遺伝子と比べて著しく低かった (Fig. 21A)。 また、両培養条件下の *AnpfkZ* の発現レベルが *A. nidulans* の全遺伝子中上位 25% 内に位置するのに対し、*pfkZ* は *A.*

*oryzae* の全遺伝子中上位 25 - 50%に位置していた (データ省略)。このことから、*pfkZ* は *AnpfkZ* と比べると転写活性が著しく低いことが考えられた。

解糖系以外の代謝系に関与する遺伝子として、ピルビン酸代謝に関連するピルビン酸カルボキシラーゼ (PC) 遺伝子と TCA 回路に関連する細胞質型リンゴ酸デヒドロゲナーゼ (MDH) 遺伝子にも、2 種間で異なる TSSs 使用法が示唆された (Fig. 22, 23)。 *A. oryzae* の PC 遺伝子 *pycA* と *A. nidulans* の *pycA* オースログ遺伝子 *AnpycA* では、2 つの TSSs (uTSS、dTSS) の存在が認められた (Fig. 22A, B)。 *pycA* では、uTSS と dTSS 由来の転写産物量が共にグルコース条件下より酢酸条件下で増加していた (Fig. 22A)。 *pycA* の各培養条件下における uTSS と dTSS のそれぞれの使用率は、第一章の 5' RACE 解析の結果 (Fig. 9E) から推定される値と異なっていたが、酢酸条件に比べてグルコース条件において uTSS 使用率が増加、dTSS 使用率が減少する点においては再現性が認められた。 *AnpycA* では、uTSS 由来の転写産物量が *pycA* と同様に酢酸条件下で増加していたものの、dTSS 由来の転写産物量はグルコースと酢酸条件で同程度であった (Fig. 22B)。結果的に、グルコース条件の *AnpycA* 発現量は酢酸条件より低い値を示したものの、その発現量の差は *pycA* よりも小さくなることが示唆された (Fig. 22A, B)。また、*A. oryzae* と *A. nidulans* の細胞質型 MDH 遺伝子 *AomdhA* と *AnmdhC* においても、2 つの TSSs (uTSS、dTSS) の存在が認められた (Fig. 23A, B)。 *AomdhA* においては、酢酸条件における uTSS と dTSS 由来の転写産物量の増加が認められ、特に uTSS はグルコース条件ではほとんど使用されないことが示唆された (Fig. 23A)。一方、 *AnmdhC* の dTSS 由来の転写産物量は、酢酸条件よりもややグルコース条件で増加していた (Fig. 23B)。これは、*AomdhA* とは反対の dTSS の使用傾向であった (Fig. 23B)。 *AnmdhC* の uTSS 由来の転写産物量は、*AomdhA* と同様に酢酸条件において増加が認められた (Fig. 23B)。しかし、グルコース条件で uTSS の使用率が全転写産物量に対して 37 %程度認められたことから (Fig. 23B)、uTSS においても *AomdhA* と *AnmdhC* 間でその使用様式が異なることが示唆された。結果的に、グルコース条件の *AnmdhC* 発現量は酢酸条件より低くなるものの、その発現量の差は *AomdhA* よりも小さいことが示唆された (Fig. 23A, B)。

以上より、*A. oryzae* と *A. nidulans* の一次代謝遺伝子群に関連する 59 のオースログ遺伝子のうち、少なくとも 7 遺伝子 (7/59, 12%) が、2 種間におけるグルコースと酢酸培養条件下での TSSs 使用様式の違いを示すことが分かった。

### 2-3-6 *A. oryzae* における解糖系酵素遺伝子高発現の生理的意義の検討

これまでの TSSs に着目した転写産物解析結果より、*A. oryzae* と *A. nidulans* 間の解糖系酵

素遺伝子群における転写制御の違いが示唆され、特に *A. oryzae* においては解糖系酵素遺伝子群がグルコース存在下で高発現する傾向が認められた。この解糖系酵素遺伝子群の高発現の意義を検討するため、*A. oryzae* に特徴的な *enoA* の dTSSs 由来の高発現がグルコース資化特性に及ぼす影響を詳細に調べた。まず、*A. oryzae* と *A. nidulans* 間の炭素源の資化様式の違いを明確に捉えるため、最少液体培地におけるバッチ培養での生育とグルコース資化特性または酢酸資化特性を比較した。その結果、酢酸培養条件では *A. nidulans* の生育速度と酢酸消費速度が *A. oryzae* よりやや高い傾向を示した一方 (Fig. 24A, B)、グルコース培養条件では *A. oryzae* の生育速度とグルコース消費速度が *A. nidulans* より高いことが認められた (Fig. 24A, B)。さらに、*A. oryzae* では *A. nidulans* において見られなかった培養液の一時的な pH の低下がグルコース条件において観察された (Fig. 24C)。以上の *A. oryzae* におけるグルコース資化特性における *enoA* 高発現の意義を検討するため、染色体上の *enoA* プロモーターを CE\_2 内推定シスエレメントに変異導入したプロモーターに置換することで *enoA* 発現量が抑制された mCS3 株 (第一章、Fig. 8A, D) の最少液体培地におけるバッチ培養でのグルコース資化特徴を調べた。その結果、*enoA* 低発現株では生育速度とグルコース消費速度が低下するとともに、増殖過程における培養液の pH 低下が抑制された (Fig. 25)。以上より、*A. nidulans* には見られない dTSS の優先的な使用に由来するグルコース存在下の *enoA* 高発現は、*A. oryzae* の迅速な生育とグルコース消費に重要であることが示唆された。

## 2-4 考察

*Aspergillus* 属糸状菌における一次代謝の多様化メカニズムの解明は、学術的、産業的に重要な課題の一つである。動物や植物などの真核生物では、AP における複数の TSSs 使用様式が異種間で多様化することが報告されており、これは遺伝子発現段階における重要な進化機構の一つであると考えられている。しかし、真菌類において AP の多様性はほとんど検討されていない。そのため、真菌類の近縁種間における TSS の比較解析は、真菌類の遺伝子発現段階における進化機構を解明する上で重要である。

本章では、*A. oryzae* の解糖系酵素遺伝子における AP の知見 (第一章) に端を発して、*Aspergillus* 属糸状菌間の一次代謝遺伝子群における AP の多様性を検討した。まず *A. oryzae* における *enoA* の糖炭素源と非糖炭素源の違いに応答する 2 つの TSSs (uTSS、dTSS) から構成される AP が、*A. oryzae* の近縁種間で保存されているか調べた。その結果、*A. flavus* 以外の糸状菌種のエノラーゼ遺伝子において、*enoA* とは異なる AP の TSSs 使用様式が示唆さ

れた (Fig. 11, 12)。特に、*A. nidulans* のエノラーゼ遺伝子 *acuN* について、TSSs 使用率と転写産物量の関連性を評価したところ、糖類系炭素源存在下において dTSS よりも uTSS の方が優先的に使用されており、さらに *enoA* において認められたグルコース条件特異的な高発現誘導が *acuN* では認められなかった (Fig. 13, 17)。次に、近縁種間における炭素源に応じた遺伝子発現量様式と AP における TSSs 使用様式の違いを一次代謝遺伝子群において包括的に検討するため、*A. oryzae* と *A. nidulans* のグルコースと酢酸培養条件下での CAGE によるトランスクリプトームデータを取得した。CAGE データに基づき、*A. oryzae* と *A. nidulans* 間の一次代謝関連遺伝子における酢酸条件の発現量に対するグルコース発現量比の違いを検討したところ (Fig. 14A, B)、*A. nidulans* よりも *A. oryzae* において、特に解糖系酵素遺伝子群がグルコース条件で高発現する傾向が認められた (Fig. 16C)。一方、2 種間で異なる TSSs 使用様式が示唆された 7 遺伝子のうち (Fig. 17-23)、4 遺伝子が *A. oryzae* で高発現する解糖系酵素遺伝子であったことから (Fig. 17-20)、*A. oryzae* における一部の解糖系酵素遺伝子群の高発現機構の獲得に AP の多様化が関連することが考えられた。最後に、*A. oryzae* に特徴的な AP の TSSs 使用法に基づく *enoA* 高発現が、迅速な生育とグルコース消費、培養液における pH 低下を特徴とする *A. oryzae* のグルコース資化様式に関与することを示した (Fig. 24, 25)。

動物や植物では、組織細胞種や発生段階の違いに基づいたゲノム網羅的な TSSs データが蓄積され、そのデータを基に異種間で TSSs が比較解析されることで、AP 多様化の進化的意義が解明されてきた(54, 55, 58, 66)。一方、真菌類においてもいくつかの種において網羅的な TSSs データが取得されているが、環境条件の違いに応じて使用頻度が変化する複数の TSSs が見られるかという視点からデータ解析はされていない(24, 67, 68)。また、近縁種同士で培養条件を揃えてデータが取得されている事例もないため、AP の進化的意義の検討は進まなかったものと思われる。本研究では *A. oryzae* と *A. nidulans* で、エノラーゼ遺伝子の TSSs 使用様式の違いを見出し、さらにその違いが見出された培養条件において網羅的 TSSs データを取得し、他の一次代謝に関連するオーソログ遺伝子間における TSSs 使用様式を比較した。そのため、本研究成果は真菌類において初めて、近縁種間における AP の多様性を検討した事例といえる。本解析では、主要な一次代謝遺伝子のみに焦点を当てたが、さらに解析対象遺伝子を広げることで真菌類における AP 多様化の進化的意義に関する知見が得られることが期待される。

*A. oryzae* の *enoA* ではグルコース条件で dTSS からの強い高発現誘導が認められる一方、*A. nidulans* の *acuN* ではグルコース条件における dTSS の使用頻度が *enoA* に比べて低下して

いることが 5'RACE と CAGE の結果から示唆された。(Fig. 13, 17)。また、ゲノム配列の類似性から推定された系統樹(1)において、*A. oryzae* と *A. nidulans* の間に位置すると考えられる *A. luchuensis* の *AlenoA* は、グルコース条件で *enoA* と *acuN* の中間的な TSSs 使用様式を示し(Fig. 14B)、*A. nidulans* と比較的近い近縁関係にあると思われる *P. chrysogenum* の *PcenoA* は *acuN* と類似した TSSs 使用様式 (Fig. 14C)、*A. oryzae* と非常に近い近縁関係にある *A. flavus* の *AfenoA* は *enoA* と類似した TSSs 使用様式 (Fig. 14D) をそれぞれ示した。以上の結果から、エノラーゼ遺伝子における AP の多様性と系統関係はある程度相関する可能性が考えられた。*Aspergillus* 属糸状菌内において、*A. oryzae* と *A. flavus* は *Flavi* 節、*A. luchuensis* は *A. niger* などが属する *Nigri* 節、*A. nidulans* は *Nidulantes* 節のサブグループにそれぞれ分類されることが提唱されているため(52)、エノラーゼ遺伝子における AP の TSSs 使用様式は、節毎に異なる傾向があるのかもしれない。しかしながら、今回解析対象とした真菌種はごく少数であるため、系統関係と TSSs 使用様式の間を結論付けることはできない。今後、解析対象とする株や種を増やして、同一種内の個体間や同一節内の種間、異なる節に属する種間のエノラーゼ遺伝子における TSSs の比較解析を進める必要がある。

*enoA* と *acuN* 間における AP の TSSs 使用様式の違いが、どのような分子機構によって生じているかを解明することは、AP 多様化の意義を深く理解する上で重要である。しかし、本研究ではその原因の特定には至らなかった。真核生物の近縁種間における一般的な転写制御の多様化機構としては、主にプロモーター上のシスエレメント配列の獲得/消失、転写因子のタンパク質間相互作用の変化、転写因子自身の機能の変化の 3 つが提唱されている(69)。以上の仮説に基づいて考察すると、*enoA* プロモーターを *acuN* プロモーターに置換しても、*enoA* 発現様式に変化は認められなかったことから (Fig. 15)、プロモーター上のシスエレメントの獲得/消失によって TSSs 使用様式に変化が生じたことは考えにくい。そのため、*Aspergillus* 属糸状菌間のプロモーター上の保存配列 CE\_1、CE\_2 内の推定シスエレメント (Fig. 4) に結合する転写因子に何らかの変化が起こった可能性が考えられた。*enoA* の dTSS 由来の転写促進に関与する転写因子は未同定であるが、uTSS からの転写促進には AcuK/AcuM が関与することが示唆されているので (Fig. 5)、*A. oryzae* 由来の AcuK/AcuM を *A. nidulans* 由来のもので置換した株の *enoA* における TSSs 使用様式を調べることで、AP 多様化機構解明の手がかりが得られるかもしれない。ただし、*acuN* プロモーター上の CE\_1 と CE\_2 がシスエレメントとして機能することを示す根拠は得られていないので、*A. nidulans* において CE\_1、CE\_2 が *acuN* 発現に及ぼす影響を調べることも、AP 多様化機構解明のための基礎的知見を得る上で重要であると思われる。

第一章の考察でも述べたように、解糖経路の亢進は迅速なエネルギー獲得に関与すると考えられることから、CAGE データより示唆された *A. oryzae* における解糖系酵素遺伝子群の高発現 (Fig. 16C) は、*A. oryzae* のグルコース存在下における迅速な生育に重要であることが考えられる。実際、*A. oryzae* はグルコース存在条件下で他の *Aspergillus* 属糸状菌よりも高い生育速度を示すことが報告されている(53)。本研究のグルコースを含む最少培地におけるバッチ培養においても、*A. oryzae* の生育速度とグルコース消費速度は、*A. nidulans* より速い傾向を示した (Fig. 24)。さらに、シスエレメントへの部位特異的変異導入により、グルコース条件における *enoA* 発現量が酢酸培養条件の発現量まで抑制された *A. oryzae* 株 (Fig. 8A-D) では、グルコース存在下における生育とグルコース消費の遅延が認められた (Fig. 25)。以上の結果は、解糖系酵素遺伝子群の高発現が *A. oryzae* の速いグルコース資化に関与するという仮説に矛盾しない。一方、*A. oryzae* のグルコースを用いたバッチ培養では、*A. nidulans* には見られなかった増殖過程における培養液 pH の一時的な低下が観察され (Fig. 24C)、*enoA* 発現抑制株においてその pH 低下は抑制された (Fig. 25)。この培養液の pH 低下の直接的な原因は、現段階では明確でない。しかし、*A. oryzae* では発酵性炭素源を用いた液体培養時にピルビン酸やリンゴ酸等の有機酸類の菌体外への漏出が確認されていることから (一瀬博論、2018)、その影響によるものと考えている。有機酸類の菌体外への漏出は、解糖の亢進によって TCA 回路の基質が過剰に供給された結果であり、*enoA* 発現抑制株では解糖の代謝流量が低下したことで有機酸漏出が低下し、最終的に pH 低下が抑制されたのではないかと予想している。以上のグルコース資化特性についての解析結果は、*A. oryzae* における解糖経路の代謝流量が、他の *Aspergillus* 属糸状菌 (少なくとも *A. nidulans*) よりも増加することを強く示唆するものであると考えられる。

*A. oryzae* と *A. nidulans* 間で異なる TSSs 使用様式が認められた 7 遺伝子のうち、エノラーゼ遺伝子を含む 4 遺伝子は、グルコース培養条件における *A. oryzae* で高発現する傾向にある解糖系酵素遺伝子であった (Table 9, Fig. 16C, 17-20)。そのうち FBA 遺伝子には、グルコース条件における dTSS の使用頻度が *A. oryzae* に比べて *A. nidulans* で低下するという点で、エノラーゼ遺伝子と類似した TSSs 使用様式の進化的変化が見られた (Fig. 18)。さらに、第一章で *A. oryzae* の *fbpA* の発現には *enoA* と同じ配列のシスエレメントが関与することが示唆されているため (Fig. 12)、エノラーゼ遺伝子と FBA 遺伝子における AP 多様化機構はある程度共通している可能性が考えられた。一方、PFK-1 遺伝子と PK 遺伝子では、オーソログ遺伝子間で TSSs の数が異なることが示唆された (Fig. 19, 20)。解糖経路において律速段階となり得る不可逆的な反応を触媒する酵素遺伝子において、以上のような転写制御に関



わる多様性が認められたことは非常に興味深い。*enoA* や *fbaA* に加えて、これらの遺伝子の TSSs の多様化がどのような分子メカニズムによって起こったかを追求することで、*A. oryzae* に特徴的なグルコース資化能力の獲得機構が解明されることが期待される。

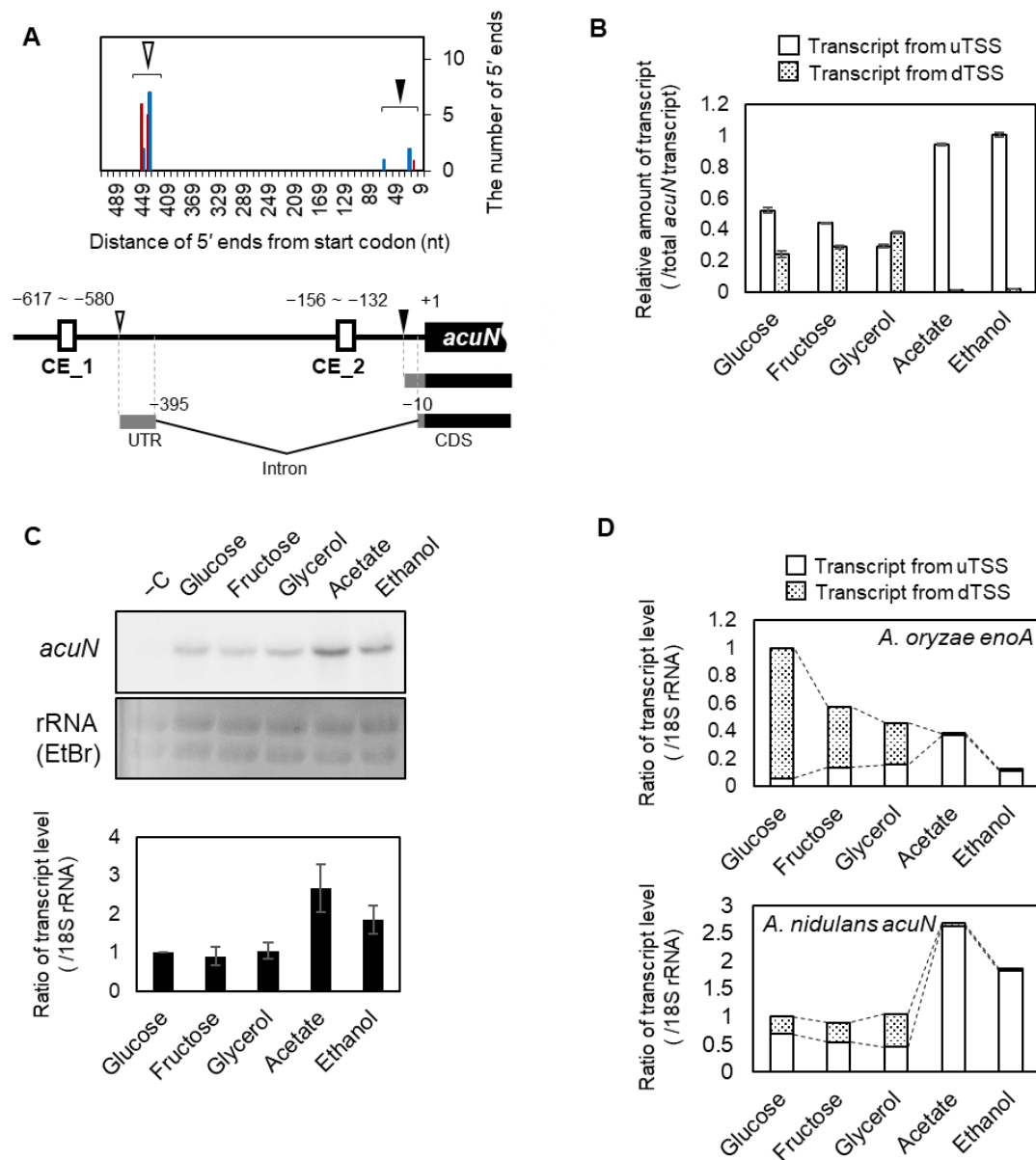
異なる TSSs 使用様式が認められた 7 遺伝子のうち、PFK-2 遺伝子も解糖経路に関与する (Table 9)。PFK-2 遺伝子においては、PFK-1 遺伝子や PK 遺伝子と同様に、オーソログ遺伝子間で TSSs の数が異なることが示唆された (Fig. 21)。しかし、その発現様式の特徴は上述した 4 遺伝子とは異なり、グルコースと酢酸の両培養条件において、*A. nidulans* と比べて *A. oryzae* の転写活性が著しく低いことが示唆された (Fig. 21)。PFK-2 は、フルクトース 6-リン酸と ATP からフルクトース 2,6-ビスリン酸を合成する酵素であり、微生物から動物までほとんど全ての生物に存在することが知られている。PFK-2 の反応産物であるフルクトース 2,6-ビスリン酸は、アロステリック制御を介して PFK-1 を強力に活性化されている(70)。*A. oryzae* において、解糖経路の PFK-1 が触媒する反応より下流の反応を触媒する酵素遺伝子はほとんど一様に酢酸条件よりも高発現する傾向にある (Fig. 16C)。実際、これらの酵素遺伝子の CPM 値は十分高い値を示した (データ省略)。*A. oryzae* では常に解糖経路の下流の反応がスムーズに進み、反応産物が蓄積されることによる PFK-1 の触媒反応速度の低下が起こりにくいため、PFK-2 による PFK-1 の活性化の必要性が低いと考えると、*A. oryzae* の *pfkZ* の発現量が低いことは理に適っていると思われる。*A. nidulans* および *A. oryzae* の PFK-2 の意義が検討された事例は報告されていないため注意が必要であるが、PFK-2 遺伝子の発現様式の違いは、2 種間における代謝特性の違いを良く反映していると考えられる。そのため、PFK-2 遺伝子における TSSs 使用様式の多様化機構の解明は、上述の 4 遺伝子のものと共に重要な課題の一つであると思われる。

解糖経路に関連する遺伝子以外では、PC 遺伝子と細胞質型 MDH 遺伝子において、2 つの TSS における使用様式の違いが認められ、それらは酢酸培養条件で *A. nidulans* より *A. oryzae* で高発現する傾向が認められた (Fig. 22, 23)。PC はピルビン酸からオキサロ酢酸の合成、MDH はリンゴ酸とオキサロ酢酸の相互変換をそれぞれ触媒する。上述したように、*A. oryzae* ではピルビン酸とリンゴ酸が発酵性炭素源存在下で菌体外に漏出する現象が認められるため (一瀬博論 2018)、これらの有機酸類の菌体外生産と PC 遺伝子または細胞質型 MDH 遺伝子の TSSs 使用様式は関連するかもしれない。ピルビン酸を基質として合成される乳酸の高生産株とリンゴ酸高生産株の育種は、*A. oryzae* において検討例があるため(5, 71)、産業的な観点から以上の関連性は今後検討されるべきであろう。

これまで、近縁種間における AP の多様性を探るという当初の目的に沿い、*A. oryzae* と *A.*

*nidulans* 間で異なる TSSs 使用様式が認められる 7 遺伝子に焦点を当てて論じたが、必ずしも AP の多様化が転写制御機構の多様化に必要であるとは言えない。実際、 $\Delta RTL$  値が 1 以上または -1 以下を示す 27 遺伝子の中で、異なる TSSs 使用様式を示した遺伝子は 6 遺伝子のみであり、残りの 21 遺伝子は TSSs の使用様式の変化を介さずに発現量様式が異種間で多様化したと思われる。そのため、AP の多様化はあくまで転写制御多様化のための一つの機構であると捉えるべきである。AP の多様化機構が、他の転写制御多様化機構と比較してどのような意義を有するのかは現時点で不明である。しかし、TSSs 使用様式の違いが認められる 7 遺伝子では、その違いが認められない 52 遺伝子と比べて  $\Delta RTL$  の絶対値が高い傾向が認められたことから ( $P = 0.49$ )、AP を介した転写制御の変化が起こることで発現様式がより多様化しやすくなるのではないかと予想している。今後、解析対象とする遺伝子数を増やした上で、以上の仮説が検証されるべきだと考えている。

本章では、*A. oryzae* の近縁種間におけるエノラーゼ遺伝子の AP の保存性の検討から端を発し、*A. oryzae* と *A. nidulans* 間の一次代謝遺伝子群の TSSs に基づく発現特徴を包括的に比較検討した。その結果、エノラーゼ遺伝子を含む複数の一次代謝遺伝子における AP の多様性が示され、さらに AP の違いに基づく発現特徴が実際に *A. oryzae* のグルコース資化特性に関連することが示唆された。以上の成果は、近縁種間における AP 多様化に基づく転写制御の違いが、任意の種の特徴的な表現型に関連することを真菌類において初めて示唆するものである。また、本研究成果は、*Aspergillus* 属糸状菌を含む真菌類の AP の進化的意義を解明する上での基礎的知見として役立つ可能性もある。



**Fig. 13 Characterization of distinct TSS usage in response to carbon source in *A. nidulans acuN***

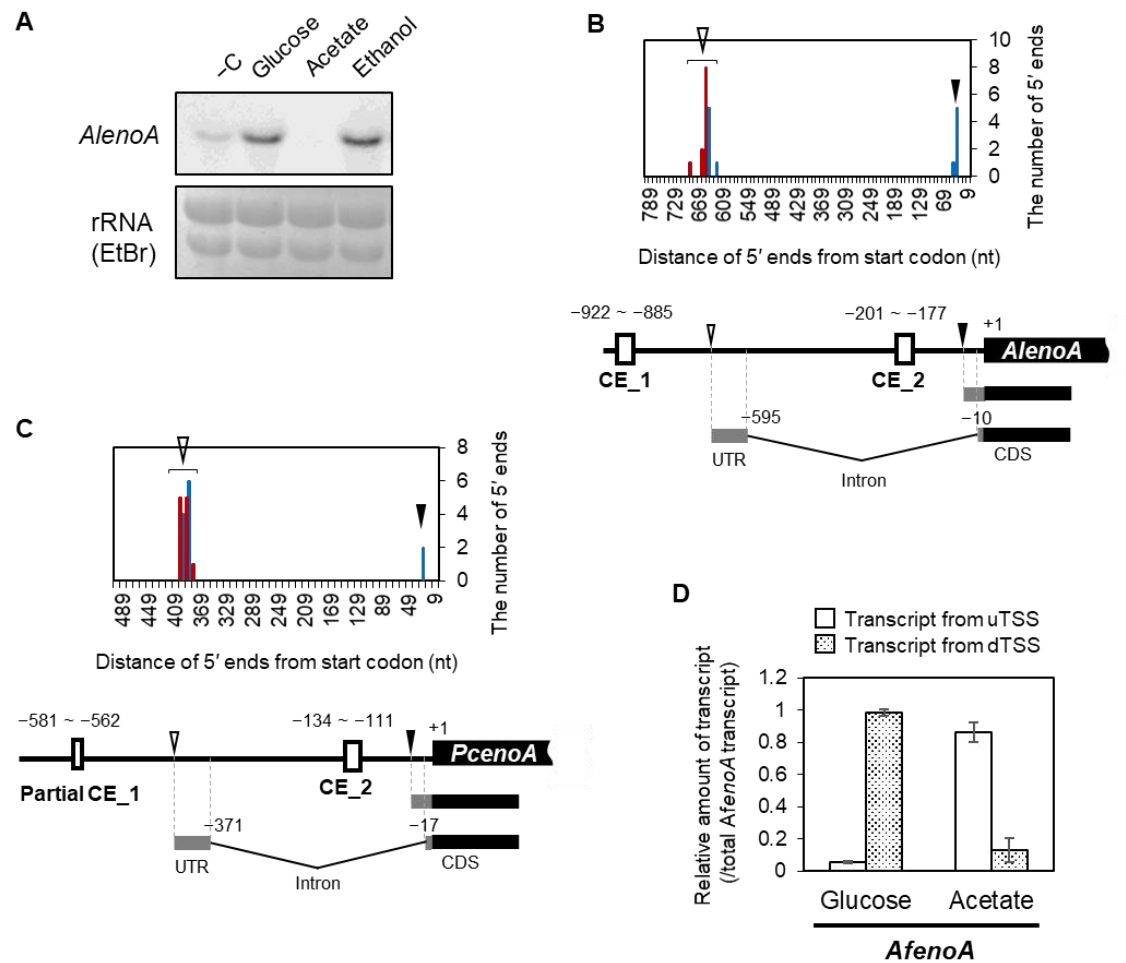
**a** Top panels: The number of *acuN* 5' ends obtained by 5' RACE. 11 to 13 5' end clones were obtained from each total RNA sample using RLM-RACE. All clones were sequenced. Total RNA samples were prepared from mycelia of *A. nidulans* FGSCA4 strain grown in MM containing 2% glucose for 36 h and then transferred to fresh MM containing 2% glucose or 2% sodium acetate. The 5' end clones obtained from samples in glucose and acetate culture conditions are shown in blue and in red, respectively. White and black arrowheads represent the uTSS and dTSS, respectively. Bottom panel:

Schematic representation of 5' end transcripts obtained by 5' RACE. Numbers represent the locations of the highly conserved sequences, CE\_1 and CE\_2, and exon/intron junctions within 5' UTR relative to the adenine nucleotide of the start codon (+1).

**b** uTSS- or dTSS-derived *acuN* transcript depending on the carbon source species. Primer sets were designed using the same strategy as in Fig. 3A. Total RNA samples were prepared from mycelia grown in MM containing 2% glucose for 36 h and then transferred to fresh MM without carbon source or containing 2% glucose, fructose, glycerol, sodium acetate, or ethanol for 4 h. Values are the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors.

**c** Top panel: Northern blot analysis of *A. nidulans acuN*. The same total RNA samples as ones in Fig. 11B were used. Bottom panel: Quantification of *acuN* transcript levels. The *acuN* transcript signal intensity was normalized to the 18S rRNA signal. The amount of *acuN* transcript in glucose conditions was set to 1.0. Values are the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors.

**d** Total transcript levels and the usage pattern of alternative TSSs in *A. oryzae enoA* (top panel) and *A. nidulans acuN* (bottom panel) under glycolytic and gluconeogenic conditions. The ratio of total transcript level in *enoA* and *acuN* is same as Fig. 3D and Fig. 11C, respectively. The ratio of each transcript derived from each TSSs in total *enoA* and *acuN* transcripts was estimated from the qRT-PCR results in Fig. 3B and Fig. 11B, respectively.



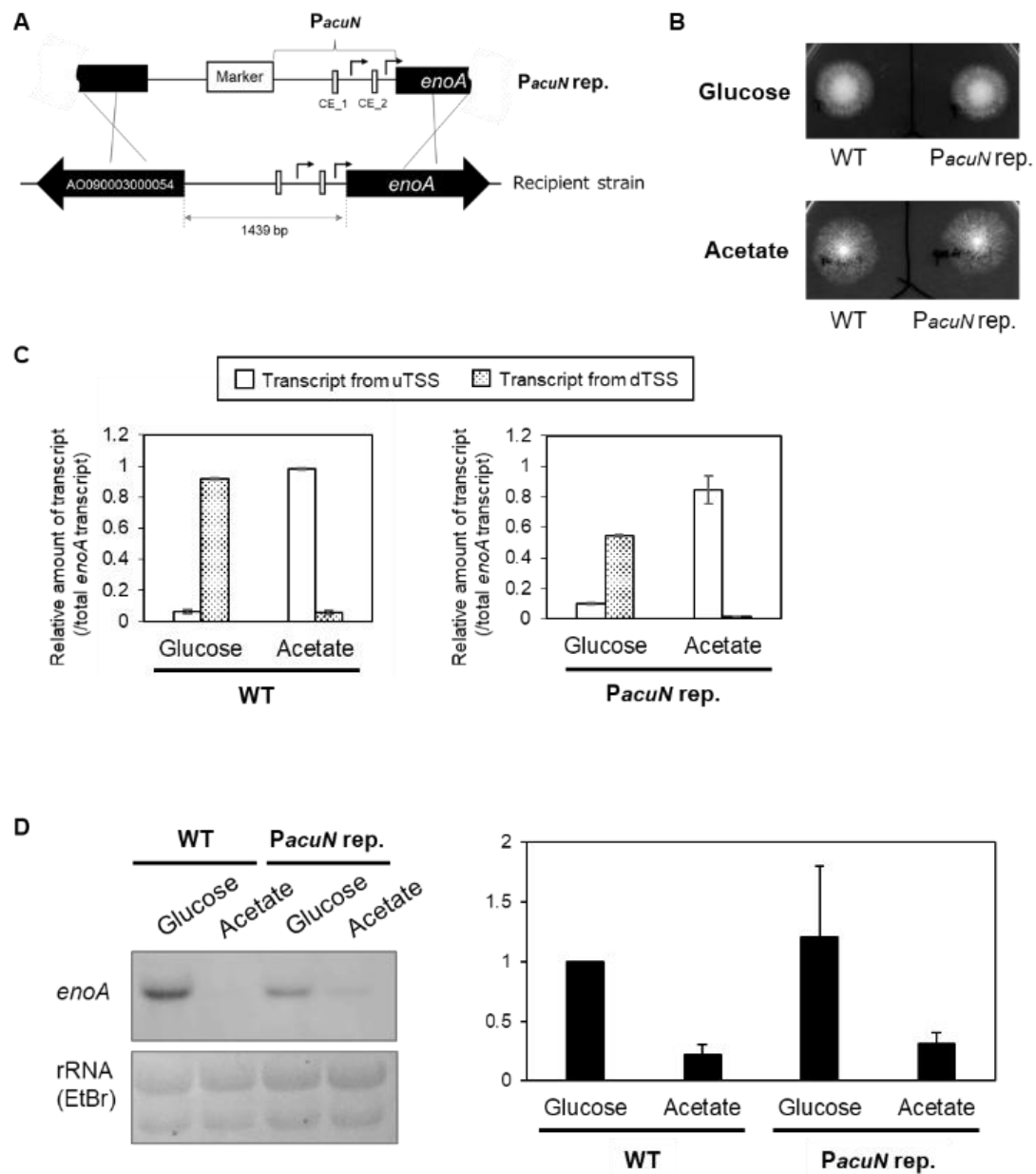
**Fig. 14 Characterization of distinct TSS usage in enolase-encoding genes in other two *Aspergilli* and *Penicillium crysogenum***

**a** Northern blot analysis of *A. luchuenesis enoA* (*AlenoA*). Total RNA samples were prepared from *A. luchuenesis*  $\Delta$  *ligD::ptrA* mycelia cultivated in MM containing 2% glucose for 36 h and then transferred to fresh MM without a carbon source or media containing 2% glucose, sodium acetate, or ethanol for 4 h.

**b** and **c** Top panels: The number of *AlenoA* (**b**) or *P. chrysogenum enoA* (*PcenOA*) (**c**) 5' ends obtained by 5' RACE. 11 to 13 5' end clones were obtained from each total RNA sample using RLM-RACE. All clones were sequenced. Total RNA samples were prepared from mycelia of *A. luchuenesis*  $\Delta$  *ligD::ptrA* or *P. chrysogenum* Q176 grown in MM containing 2% glucose for 36 h and then transferred to fresh MM containing 2% glucose or 2% ethanol (**b**), or containing 2% glucose or 2% sodium acetate (**c**). The 5' end clones obtained from samples in glucose and the other carbon source

conditions are shown in blue and in red, respectively. White and black arrowheads represent the uTSS and dTSS, respectively. Bottom panel: Schematic representation of 5' end transcripts obtained by 5' RACE. Numbers represent the locations of the highly conserved sequences, CE\_1 and CE\_2, and exon/intron junctions within 5' UTR relative to the adenine nucleotide of the start codon (+1).

**d** uTSS- or dTSS-derived *A. flavus enoA* (*AfenoA*) transcript depending on the carbon source species. Primer sets were designed using the same strategy as in Fig. 3A. Total RNA samples were prepared from mycelia grown in MM containing 2% glucose for 36 h and then transferred to fresh MM without carbon source or containing 2% glucose or sodium acetate for 4 h. Values are the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors.



**Fig. 15 Replacement of *enoA* promoter with *acuN* promoter in *A. oryzae***

**a** Schematic representation of the replacement of native *enoA* promoter with the *acuN* promoter in *A. oryzae*

**b** Growth on agar plates with glucose or acetate. Conidia ( $10^3$ ) were grown on agar plate of MM containing 2% glucose or 2% sodium acetate for 3 days at 30°C.

**c** uTSS or dTSS-derived *enoA* transcript levels depending on the carbon source. Primer sets were designed using the same strategy as in Fig. 1B. Total RNA samples were prepared from mycelia grown in MM containing 2% glucose for 36 h and then transferred to fresh MM containing 2% glucose or sodium acetate for 4 h. Values represent the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors.

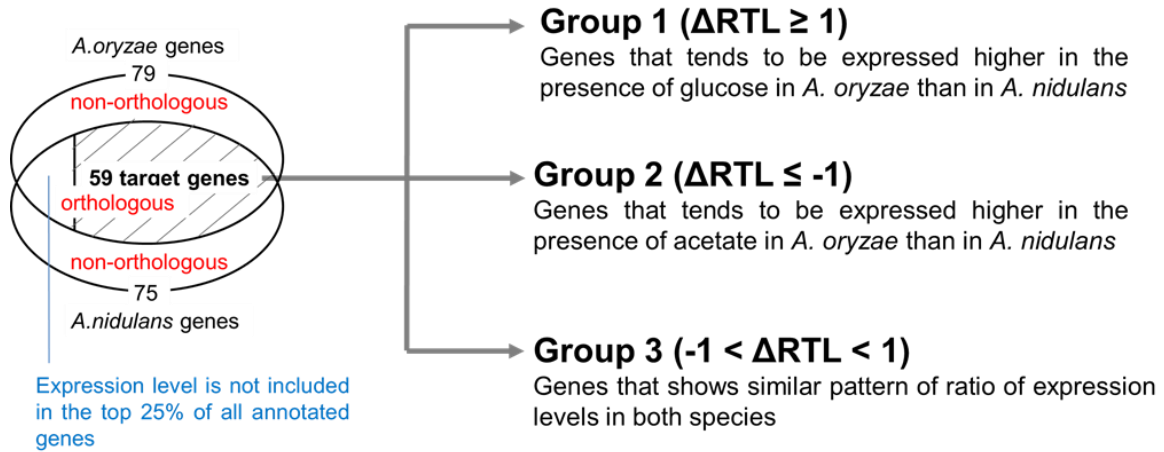
**d** Left panel: Northern blot analysis on *enoA*. Total RNA samples were prepared from mycelia cultivated in MM containing 2% glucose for 36 h and then transferred to fresh MM containing 2% glucose or sodium acetate for 4 h. Right panel: Quantification of *enoA* transcript levels. The *enoA* transcript signal intensity was normalized to the 18S rRNA signal. The amount of *enoA* transcript in glucose conditions in WT strain was set to 1.0. Values are the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors.



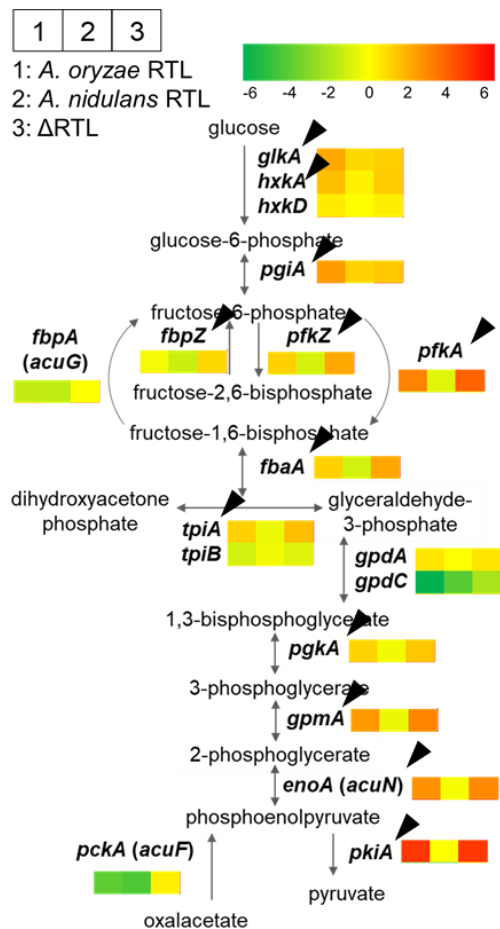
A

$$\Delta\text{Ratio of transcript level } (\Delta\text{RTL}) = \log_2\left(\frac{\text{CPM}_{\text{Glc}}^*}{\text{CPM}_{\text{Ace}}}\right)_{A. \text{oryzae}} - \log_2\left(\frac{\text{CPM}_{\text{Glc}}}{\text{CPM}_{\text{Ace}}}\right)_{A. \text{nidulans}}$$

B



C

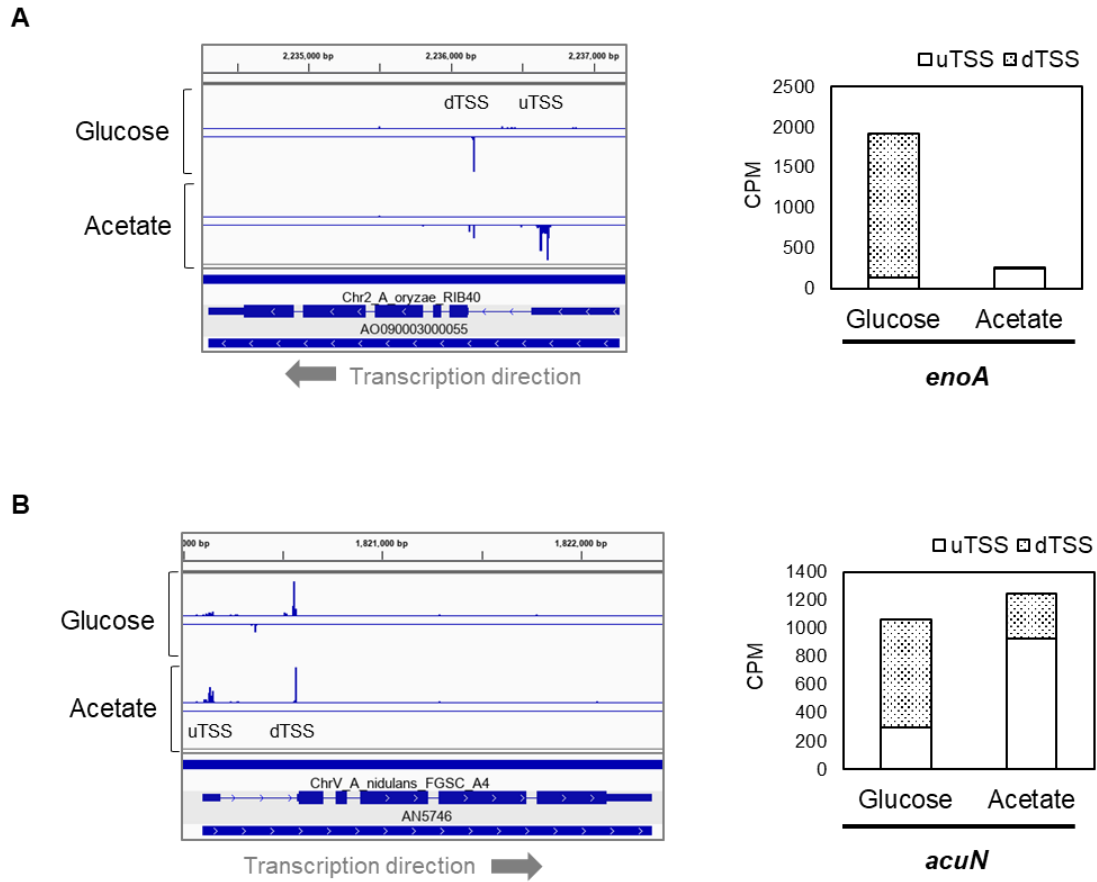


**Fig. 16 Differential analysis of ratio of transcript level (RTL) pattern between *A. oryzae* and *A. nidulans***

**a** Criterion for diversification in gene expression. The ratio of transcript level under glucose-condition to that under acetate-condition (RTL) was calculated in each target gene in *A. oryzae* and *A. nidulans*. Then,  $\Delta$ RTL was calculated by subtraction of RTL in *A. nidulans* from RTL in *A. oryzae* as the criterion for evaluating diversification in transcriptional regulation pattern in glucose- and acetate-culture condition between *A. oryzae* and *A. nidulans*. \*CPM: Counts per million, a unit for expression level in CAGE.

**b** The flow chart for classification of orthologous primary metabolic gene sets between *A. oryzae* and *A. nidulans* based on  $\Delta$ RTL. Highly expressing orthologous gene sets relevant to glycolysis, gluconeogenesis, pyruvate catabolism, TCA cycle and pentose phosphate pathway were selected and divided into three groups.

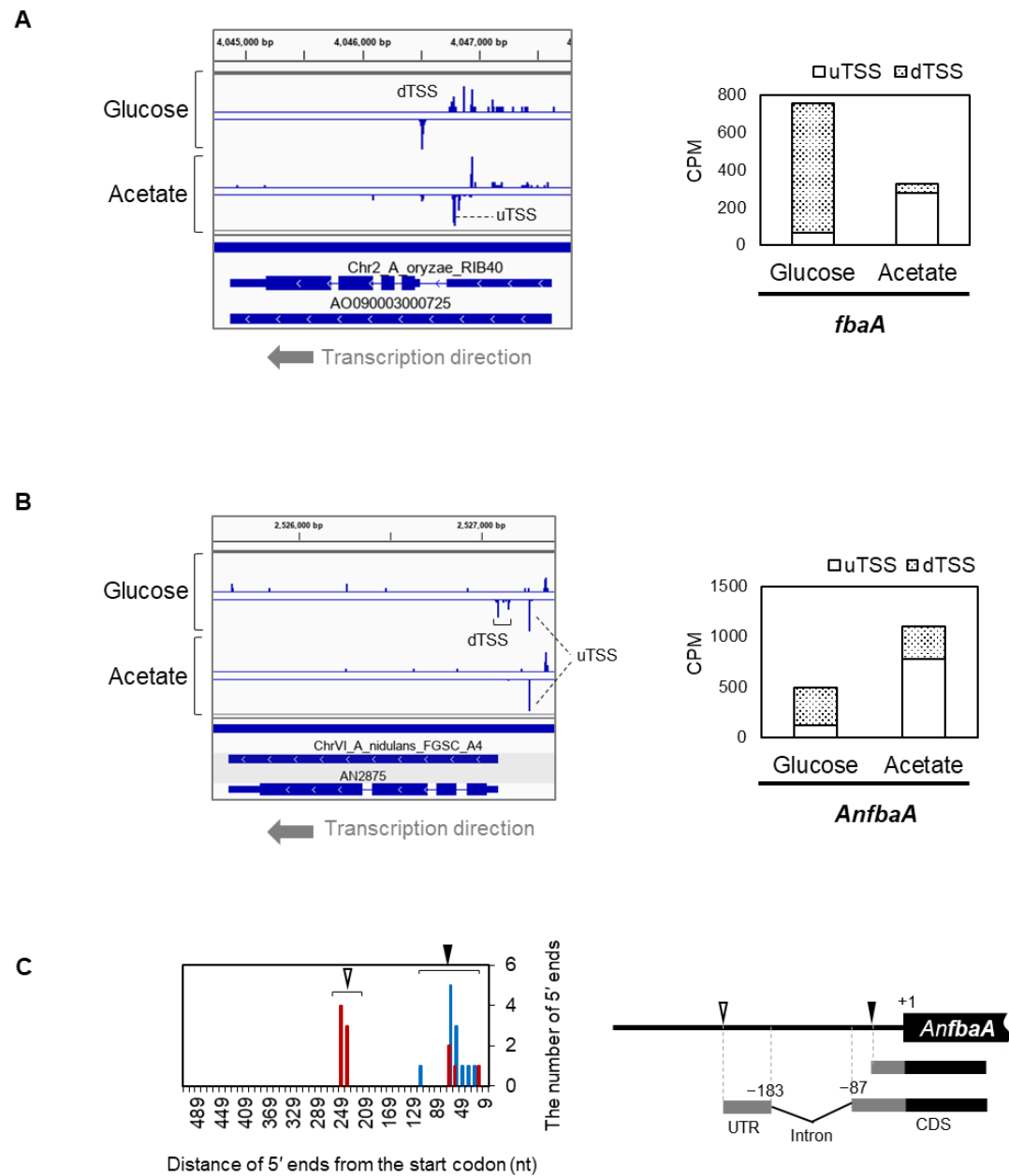
**c**  $\Delta$ RTL profiles of genes encoding enzymes for glycolysis and gluconeogenesis in *A. oryzae* and *A. nidulans*. Green, yellow, red in heat maps indicate low, middle and high intensity in each values, respectively. Columns 1, 2 and 3 represent RTL in *A. oryzae*, RTL in *A. nidulans*, and  $\Delta$ RTL, respectively. Oblique filled arrows indicate the genes included in G1 group.



**Fig. 17 Comparison of TSSs usage pattern in enolase-encoding gene between *A. oryzae* and *A. nidulans***

**a** and **b** TSSs information obtained by CAGE in *A. oryzae enoA* (**a**) and *A. nidulans acuN* (**b**). Left panel: Visualization of the result of mapping of 5' sequence reads in CAGE by IGV tool (65). Each blue peak indicates the chromosomal positions where 5' sequence reads were mapped. Right panel: Expression level in putative TSSs of *enoA* or *acuN*.



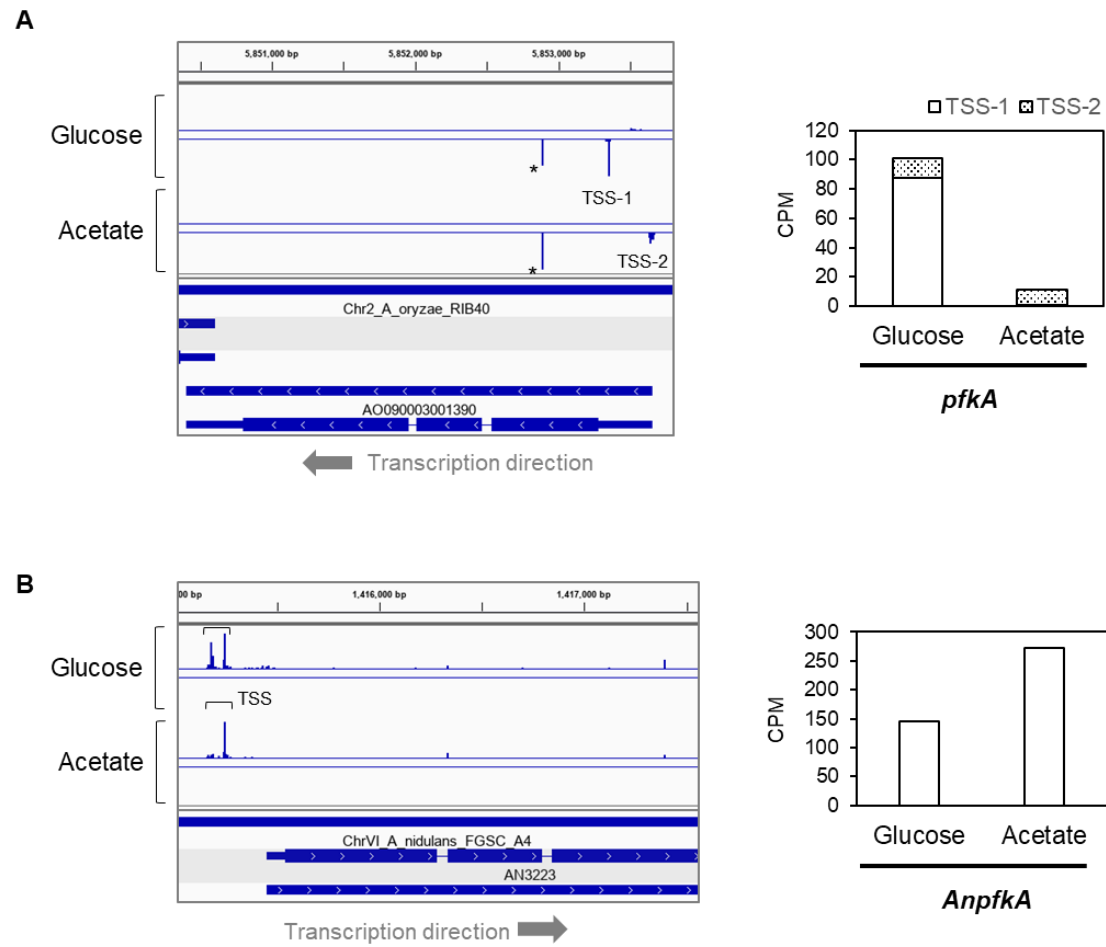


**Fig. 18 Comparison of TSSs usage pattern in fructose-bisphosphate aldolase-encoding gene between *A. oryzae* and *A. nidulans***

**a** and **b** TSSs information obtained by CAGE in *A. oryzae fbaA* (**a**) and *A. nidulans fbaA* (*AnfbaA*) (**b**). Left panel: Visualisation of the result of mapping of 5' sequence reads in CAGE by IGV tool (65). Each blue peak indicates the chromosomal positions where 5' sequence reads were mapped. Right panel: Expression level in putative TSSs of *fbaA* or *AnfbaA*.

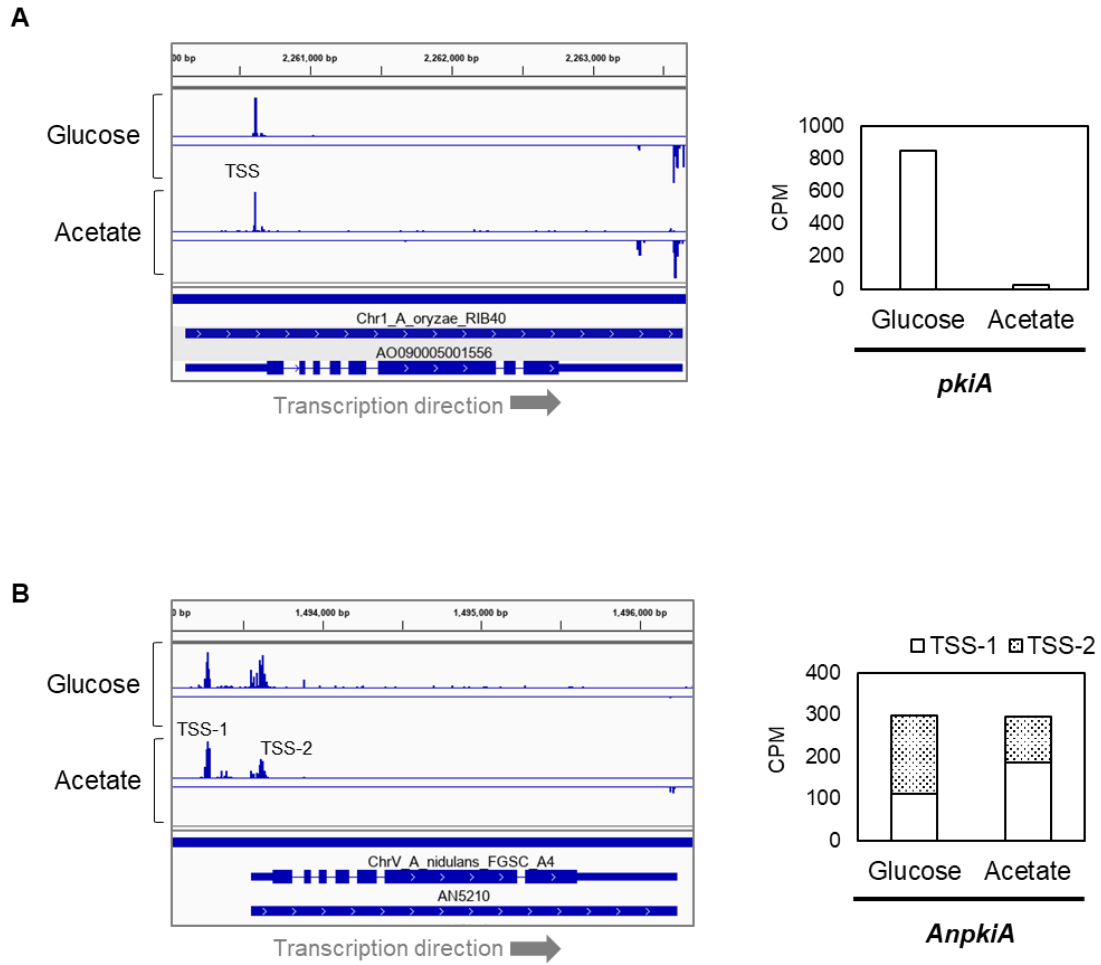
**c** Left panel: The number of *AnfbaA* 5' ends obtained by 5' RACE. Ten to twelve clones were obtained

from each total RNA sample using RLM-RACE. All clones were sequenced. Total RNA samples were prepared from mycelia samples cultured by following the same method as CAGE. The clones of 5' ends obtained from samples in glucose and acetate culture conditions are shown in blue and in red, respectively. White and black arrowheads represent the uTSS and dTSS, respectively. Right panel: Schematic representation of 5' end transcripts obtained by 5' RACE. Numbers represent the locations of exon/intron junctions within the 5' UTR relative to the adenine nucleotide of the start codon (+1).



**Fig. 19 Comparison of TSSs usage pattern in phosphofructokinase1-encoding gene between *A. oryzae* and *A. nidulans***

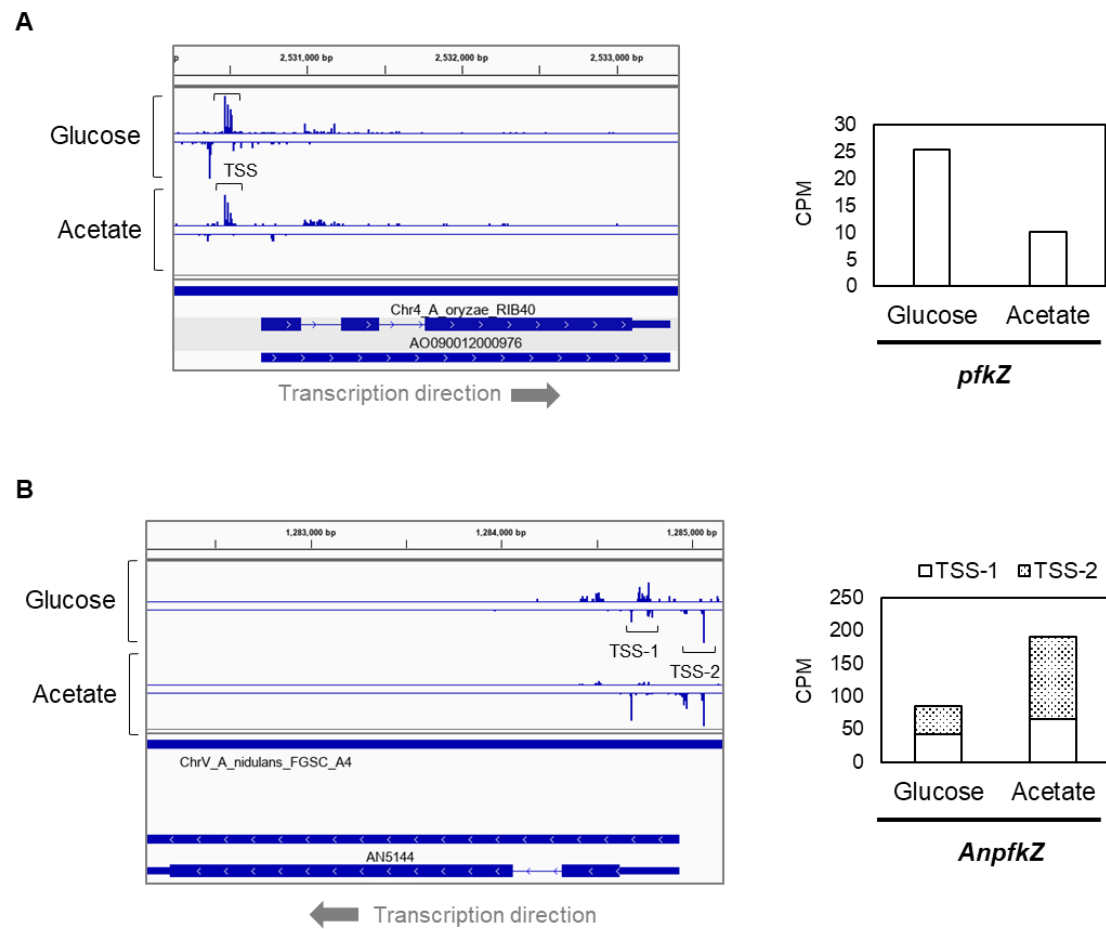
**a** and **b** TSSs information obtained by CAGE in *A. oryzae pfkA* (**a**) and *A. nidulans pfkA* (*AnpfkA*) (**b**). Left panel: Visualisation of the result of mapping of 5' sequence reads in CAGE by IGV tool (65). Each blue peak indicates the chromosomal positions where 5' sequence reads were mapped. The peaks indicated by “\*” were false-positive peaks with low expression levels. Right panel: Expression level in putative TSSs of *pfkA* or *AnpfkA*.



**Fig. 20 Comparison of TSSs usage pattern in pyruvate kinase-encoding gene between *A. oryzae* and *A. nidulans***

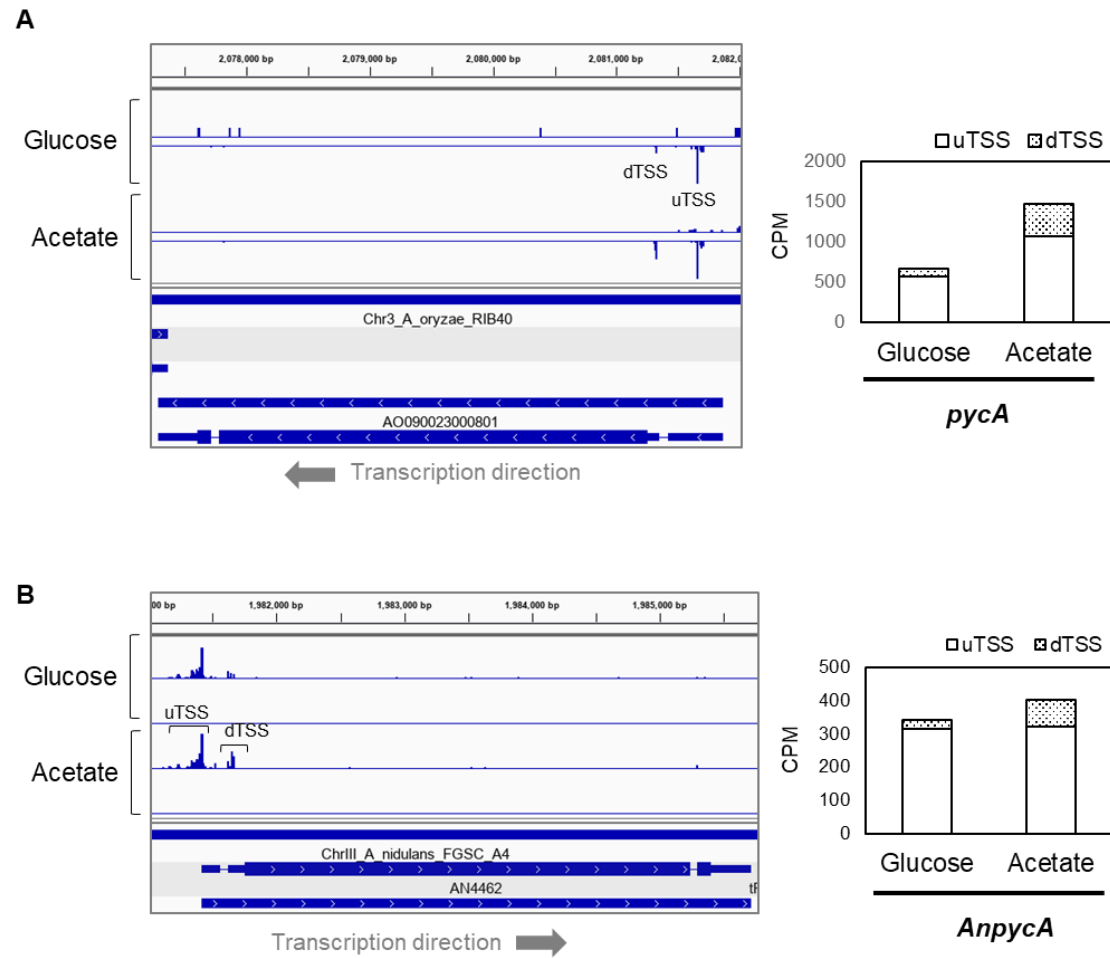
**a** and **b** TSSs information obtained by CAGE in *A. oryzae pkiA* (**a**) and *A. nidulans pkiA* (*AnpkiA*) (**b**). Left panel: Visualisation of the result of mapping of 5' sequence reads in CAGE by IGV tool (65). Each blue peak indicates the chromosomal positions where 5' sequence reads were mapped. Right panel: Expression level in putative TSSs of *pkiA* or *AnpkiA*.





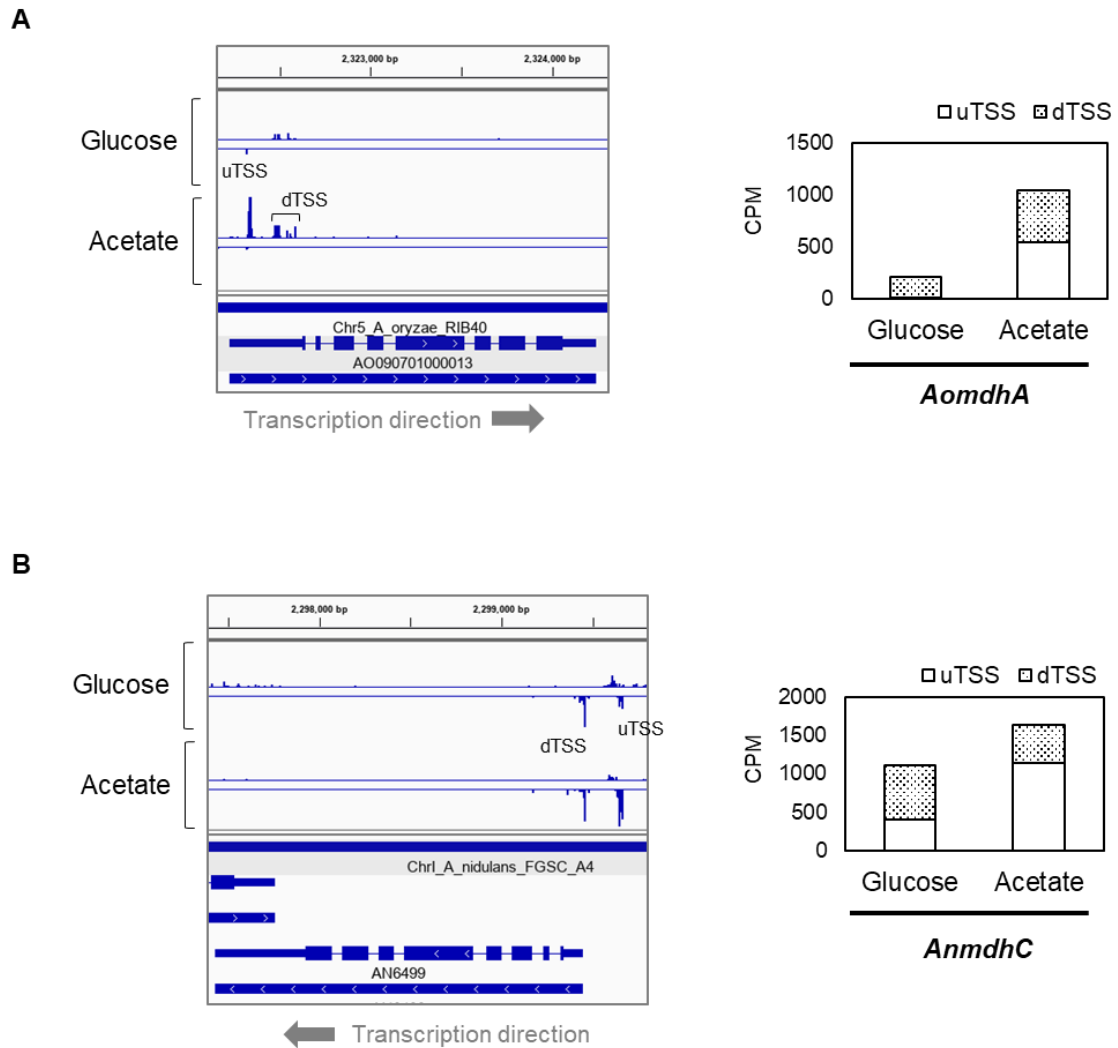
**Fig. 21 Comparison of TSSs usage pattern in phosphofructokinase2-encoding gene between *A. oryzae* and *A. nidulans***

**a** and **b** TSSs information obtained by CAGE in *A. oryzae* *pfkZ* (**a**) and *A. nidulans* *pfkZ* (*AnpfkZ*) (**b**). Left panel: Visualisation of the result of mapping of 5' sequence reads in CAGE by IGV tool (65). Each blue peak indicates the chromosomal positions where 5' sequence reads were mapped. Right panel: Expression level in putative TSSs of *pfkA* or *AnpfkA*.



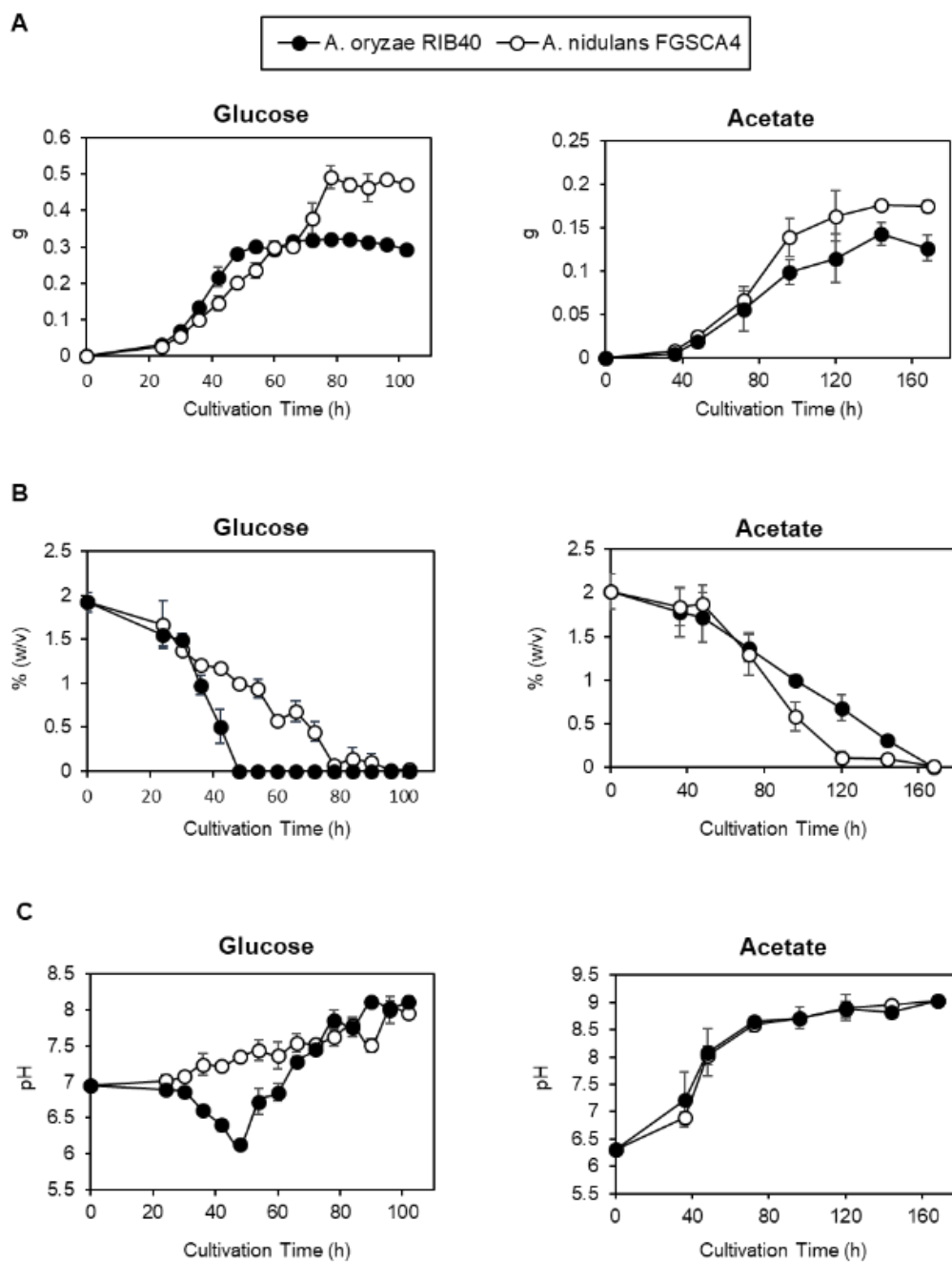
**Fig. 22 Comparison of TSSs usage pattern in pyruvate carboxylase-encoding gene between *A. oryzae* and *A. nidulans***

**a** and **b** TSSs information obtained by CAGE in *A. oryzae pycA* (**a**) and *A. nidulans pycA* (*AnpfkA*) (**b**). Left panel: Visualisation of the result of mapping of 5' sequence reads in CAGE by IGV tool (65). Each blue peak indicates the chromosomal positions where 5' sequence reads were mapped. Right panel: Expression level in putative TSSs of *pycA* or *AnpycA*.



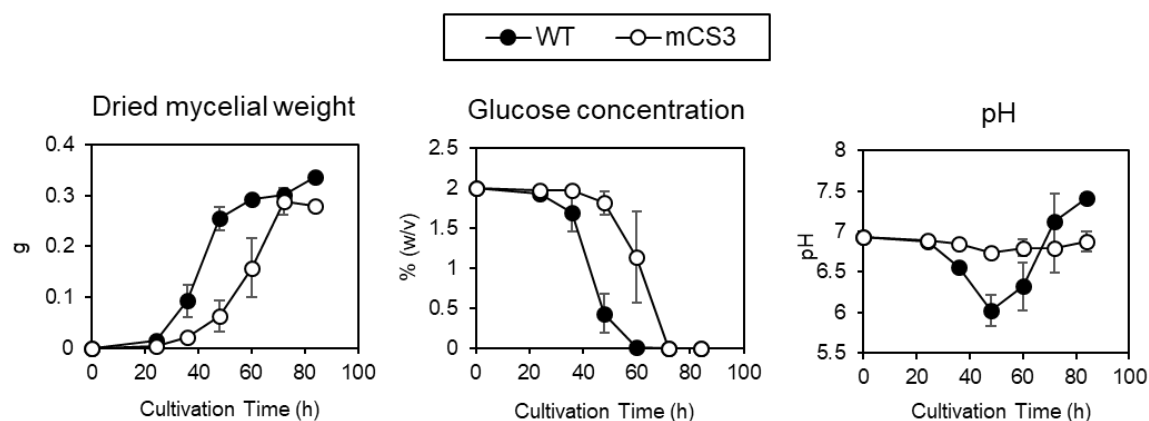
**Fig. 23 Comparison of TSSs usage pattern in cytoplasmic malate dehydrogenase-encoding gene between *A. oryzae* and *A. nidulans***

**a** and **b** TSSs information obtained by CAGE in *A. oryzae mdhA* (*AomdhA*) (**a**) and *A. nidulans mdhC* (*AnmdhC*) (**b**). Left panel: Visualisation of the result of mapping of 5' sequence reads in CAGE by IGV tool (65). Each blue peak indicates the chromosomal positions where 5' sequence reads were mapped. Right panel: Expression level in putative TSSs of *AomdhA* or *AnmdhC*



**Fig. 24 Characteristic of glucose and acetate assimilation during batch submerged cultivation in *A. oryzae* and *A. nidulans***

Dried mycelial weight (a), glucose or acetate concentration in culture (b) and pH in culture (c) during batch cultivation in submerged medium. Conidia ( $10^7$ ) of *A. oryzae* RIB40 or *A. nidulans* FGSCA4 were cultivated in MM containing 2% glucose or 2% sodium acetate. Values are the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors.



**Fig. 25 The effect of putative cis-element mutation in *enoA* promoter on glucose assimilation during batch submerged cultivation**

Dried mycelial weight (left), glucose concentration in culture (middle) and pH in culture (right) during batch cultivation in submerged medium. Conidia ( $10^7$ ) were cultivated in MM containing 2% glucose. Values are the means of three independent experiments. Error bars represent the standard errors.

Sample	Total	rRNA-filtered	BWA-Mapped	BWA_others		Totally Mapped		Totally Used
				Total	HISAT2-mapped	HISAT2_Unique		
A. oryzae Glc-1	17,755,635	17,755,634	13,726,670	4,030,269	3,886,380	421,809	17,613,050	14,148,479 (79.68%)
A. oryzae Glc-2	16,991,722	16,991,721	13,332,107	3,660,587	3,540,865	324,508	16,872,972	13,656,615 (80.38%)
A. oryzae Ace-1	17,003,955	17,003,952	12,571,614	4,433,429	4,300,508	475,970	16,872,122	13,047,584 (76.73%)
A. oryzae Ace-2	17,212,045	17,212,043	12,918,980	4,294,209	4,183,971	440,333	17,102,951	13,359,313 (77.61%)
A. nidulans Glc-1	19,221,820	19,221,820	9,231,570	9,990,297	25,122	10,648	9,256,692	9242218 (48.08%)
A. nidulans Glc-2	17,702,947	17,702,947	9,340,588	8,362,395	25,134	10,163	9,365,722	9350751 (52.82%)
A. nidulans Ace-1	18,291,398	18,291,398	10,726,230	7,565,206	29,558	12,618	10,755,788	10738848 (58.71%)
A. nidulans Ace-2	19,110,381	19,110,381	11,138,582	7,971,843	32,316	13,115	11,170,898	11151697 (58.35%)

**Table 6. Mapping information in CAGE**

rRNA-filtered: the retained reads after the reads from rRNA were filtered.

BWA-Mapped: BWA-mapped read with MAPQ  $\geq 20$ .

BWA\_Others: the read with MAPQ  $< 20$  in BWA mapping. These reads were mapped again by HISAT2.

HISAT2\_Unique: HISAT2-mapped with the tag NH:i:1.

Totally Mapped: sum of BWA-Mapped and HISAT2-mapped.

Totally Used: sum of BWA-Mapped and HISAT2\_Unique. These reads were used for subsequent analysis.

The number in parentheses indicates the percentage ratio to rRNA-filtered number.

		Min	Q <sub>1</sub>	Q <sub>2</sub>	Q <sub>3</sub>	Max
<i>A.oryzae</i>	Glc	0	7.88375	28.73	73.7575	16488.17
	Ace	0	9.115	31.665	77.545	14352.51
<i>A. nidulans</i>	Glc	0	12.2575	34.72	80.8	21837.18
	Ace	0	11.6875	33.565	82.145	19735.82

**Table 7. Quatile value of CPM of the genes used for annotation of TSS clusters in CAGE**

	$\Delta RTL \geq 1$	$\Delta RTL \leq -1$	$-1 < \Delta RTL < 1$	Total
Glycolysis / Gluconeogenesis	12 ( <b>71</b> , <b>67</b> )	1 (10, 6)	5 (16, 28)	18
Pyruvate catabolism	2 (12, 18)	3 (30, 27)	6 (19, <b>54</b> )	11
TCA / Glyoxylate cycle	2 (12, 10)	4 ( <b>40</b> , 19)	15 ( <b>47</b> , <b>71</b> )	21
Pentose phosphate pathway	1 ( 6, 11)	2 (20, 22)	6 (19, <b>67</b> )	9
Total	17 (100, 29)	10 (100, 17)	32 (100, 54)	59

**Table 8. The number of orthologous gene set in each  $\Delta RTL$  category** The left and right number in parentheses indicates the percentage ratio to the bottom and right total number, respectively. The highest percentage ratios to the bottom and right total number are shown in red.

Metabolic pathway	Enzyme	Gene ID	Gene name	Putative TSSs number	CPM (Glucose)	CPM (Acetate)	RTL	$\Delta$ RTL
Glycolysis	Enolase	AO090003000055	<i>enoA</i>	2	1942.0	276.9	2.81	3.03
		AN5746	<i>acuN</i>	2	1108.3	1290.5	-0.22	
	Aldolase	AO090003000725	<i>fbaA</i>	2	764.7	336.2	1.19	2.28
		AN2875	<i>fbaA</i>	2	551.3	1181.2	-1.10	
	Phospho fructokinase 1	AO090003001390	<i>pfkA</i>	2	104.0	11.4	3.19	3.99
		AN3223	<i>pfkA</i>	1	169.5	293.9	-0.79	
	Phospho fructokinase 2	AO090012000976	<i>pfkZ</i>	1	29.8	13.1	1.18	2.24
		AN5144	<i>pfkZ</i>	2	106.4	221.3	-1.06	
TCA cycle	Pyruvate kinase	AO090005001556	<i>pkIA</i>	1	850.6	24.2	5.14	5.12
		AN5210	<i>pkIA</i>	2	304.7	300.6	0.02	
	Malate dehydrogenase	AO090701000013	<i>mdhA</i>	2	239.4	1221.5	-2.35	-1.84
		AN6499	<i>mdhC</i>	2	1179.4	1681.5	-0.51	
Pyruvate catabolism	Pyruvate carboxylase	AO090023000801	<i>pycA</i>	2	676.1	1488.6	-1.14	-0.951
		AN4462	<i>pycA</i>	2	392.4	446.9	-0.19	

**Table 9. The list of orthologous gene set that shows different TSSs usage between *A. oryzae* and *A. nidulans*** The number began with AO and AN shows *A. oryzae* Gene ID and *A. nidulnas* Gene ID, respectively.

## 総括

本博士論文では、*Aspergillus* 属糸状菌における解糖系遺伝子の選択的プロモーター (AP) による転写制御について解析を行った。第一章では、日本の醸造産業に重要な黄麹菌 *A. oryzae* において、エノラーゼ遺伝子 *enoA* の炭素源の違いに応答した発現量調節に重要と思われる AP による転写制御機構の一端が解明された。また、同様の分子機構がアルドラーゼ遺伝子 *fbaA* の AP による転写制御にも働いている可能性が示された。第二章では、*Aspergillus* 属糸状菌のエノラーゼ遺伝子やアルドラーゼ遺伝子を含む複数の一次代謝遺伝子群において、AP の TSSs 使用様式が近縁種間で異なることが示唆された。さらに、その違いが *A. oryzae* の特徴的なグルコース資化特性に関連する可能性があることが示された。世界的にみて、*Aspergillus* 属糸状菌の一次代謝遺伝子の転写制御機構は、菌体外分泌酵素遺伝子の転写制御機構やカタボライト抑制機構などの糸状菌の物質生産に直接結び付く機構と比較すると研究例は少ない。しかし、本研究で TSSs に着目した解析が行われたことで、これまで見過ごされていた一次代謝遺伝子の転写制御における精密さや多様性が示唆されたと思われる。今後、本研究成果に基づく解析が進むことで、それぞれの *Aspergillus* 属糸状菌類の代謝特性を決定づけるような重要な分子機構が解明され、その知見が醸造産業などの *Aspergillus* 属糸状菌が利用される産業に役立てられることを期待している。



## 参考文献

1. **Gibbons JG, Rokas A.** 2013. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends in Microbiology* **21**:14-22.
2. **Machida M, Asai K, Sano M, Tanaka T, Kumagai T, Terai G, Kusumoto KI, Arima T, Akita O, Kashiwagi Y, Abe K, Gomi K, Horiuchi H, Kitamoto K, Kobayashi T, Takeuchi M, Denning DW, Galagan JE, Nierman WC, Yu JJ, Archer DB, Bennett JW, Bhatnagar D, Cleveland TE, Fedorova ND, Gotoh O, Horikawa H, Hosoyama A, Ichinomiya M, Igarashi R, Iwashita K, Juvvadi PR, Kato M, Kato Y, Kin T, Kokubun A, Maeda H, Maeyama N, Maruyama J, Nagasaki H, Nakajima T, Oda K, Okada K, Paulsen I, Sakamoto K, Sawano T, Takahashi M, Takase K, Terabayashi Y, Wortman JR, et al.** 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* **438**:1157-1161.
3. **Machida M, Yamada O, Gomi K.** 2008. Genomics of *Aspergillus oryzae*: Learning from the History of Koji Mold and Exploration of Its Future. *DNA Research* **15**:173-183.
4. **Oda K, Kakizono D, Yamada O, Iefuji H, Akita O, Iwashita K.** 2006. Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:3448-3457.
5. **Brown SH, Bashkirova L, Berka R, Chandler T, Doty T, McCall K, McCulloch M, McFarland S, Thompson S, Yaver D, Berry A.** 2013. Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**:8903-8912.
6. **Yang L, Lubeck M, Lubeck PS.** 2017. *Aspergillus* as a versatile cell factory for organic acid production. *Fungal Biology Reviews* **31**:33-49.
7. **Sakai K, Kinoshita H, Nihira T.** 2012. Heterologous expression system in *Aspergillus oryzae* for fungal biosynthetic gene clusters of secondary metabolites. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**:2011-2022.
8. **Yoshimi A, Yamaguchi S, Fujioka T, Kawai K, Gomi K, Machida M, Abe K.** 2018. Heterologous Production of a Novel Cyclic Peptide Compound, KK-1, in *Aspergillus oryzae*. *Frontiers in Microbiology* **9**:12.
9. **Nakajima K, Kunihiro S, Sano M, Zhang Y, Eto S, Chang YC, Suzuki T, Jigami Y, Machida M.** 2000. Comprehensive cloning and expression analysis of glycolytic genes from the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics* **37**:322-327.
10. **Maeda H, Sano M, Maruyama Y, Tanno T, Akao T, Totsuka Y, Endo M, Sakurada R, Yamagata Y, Machida M, Akita O, Hasegawa F, Abe K, Gomi K, Nakajima T, Iguchi Y.** 2004. Transcriptional analysis of genes for energy catabolism and hydrolytic enzymes in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae* using cDNA microarrays and expressed sequence tags. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**:74-83.

11. **Machida M, Chang YC, Manabe M, Yasukawa M, Kunihiro S, Jigami Y.** 1996. Molecular cloning of a cDNA encoding enolase from the filamentous fungus, *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics* **30**:423-431.
12. **Holland MJ, Holland JP.** 1978. ISOLATION AND IDENTIFICATION OF YEAST MESSENGER RIBONUCLEIC-ACIDS CODING FOR ENOLASE, GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE, AND PHOSPHOGLYCERATE KINASE. *Biochemistry* **17**:4900-4907.
13. **Tsuboi H, Koda A, Toda T, Minetoki T, Hirotsune M, Machida M.** 2005. Improvement of the *Aspergillus oryzae* enolase promoter (P-enoA) by the introduction of cis-element repeats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **69**:206-208.
14. **Chambers A, Packham EA, Graham IR.** 1995. Control of glycolytic gene expression in the budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Current Genetics* **29**:1-9.
15. **Toda T, Sano M, Honda M, Rimoldi O, Yang Y, Yamamoto M, Takase K, Hirozumi K, Kitamoto K, Minetoki T, Gomi K, Machida M.** 2001. Deletion analysis of the enolase gene (enoA) promoter from the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics* **40**:260-267.
16. **Akao T, Sano M, Yamada O, Akeno T, Fujii K, Goto K, Ohasi-Kunihiro S, Takase K, Yasukawa-Watanabe M, Yamaguchi K, Kurihara Y, Maruyama JI, Juvvadi PR, Tanaka A, Hata Y, Koyama Y, Yamaguchi S, Kitamoto N, Gomi K, Abe K, Takeuchi M, Kobayashi T, Horiuchi H, Kitamoto K, Kashiwagi Y, Machida M, Akita O.** 2007. Analysis of expressed sequence tags from the fungus *Aspergillus oryzae* cultured under different conditions. *DNA Research* **14**:47-57.
17. **Hynes MJ, Szewczyk E, Murray SL, Suzuki Y, Davis MA, Lewis HMS.** 2007. Transcriptional control of gluconeogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **176**:139-150.
18. **Suzuki Y, Murray SL, Wong KH, Davis MA, Hynes MJ.** 2012. Reprogramming of carbon metabolism by the transcriptional activators AcuK and AcuM in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **84**:942-964.
19. **de Klerk E, t Hoen PAC.** 2015. Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing. *Trends in Genetics* **31**:128-139.
20. **McAlister L, Holland MJ.** 1982. TARGETED DELETION OF A YEAST ENOLASE STRUCTURAL GENE - IDENTIFICATION AND ISOLATION OF YEAST ENOLASE ISOZYMES. *Journal of Biological Chemistry* **257**:7181-7188.
21. **Flippin M, Sun JB, Robellet X, Karaffa L, Fekete E, Zeng AP, Kubicek CP.** 2009. Biodiversity and evolution of primary carbon metabolism in *Aspergillus nidulans* and other *Aspergillus* spp. *Fungal Genetics and Biology* **46**:S19-S44.
22. **Prade RA, Timberlake WE.** 1993. THE ASPERGILLUS-NIDULANS BRLA

REGULATORY LOCUS CONSISTS OF OVERLAPPING TRANSCRIPTION UNITS THAT ARE INDIVIDUALLY REQUIRED FOR CONIDIOPHORE DEVELOPMENT. *Embo Journal* **12**:2439-2447.

23. **Szewczyk E, Andrianopoulos A, Davis MA, Hynes MJ.** 2001. A single gene produces mitochondrial, cytoplasmic, and peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biological Chemistry* **276**:37722-37729.
24. **Cheng CK, Au CH, Wilke SK, Stajich JE, Zolan ME, Pukkila PJ, Kwan HS.** 2013. 5'-Serial Analysis of Gene Expression studies reveal a transcriptomic switch during fruiting body development in *Coprinopsis cinerea*. *Bmc Genomics* **14**:17.
25. **Kaur JN, Panepinto JC.** 2016. Morphotype-specific effector functions of *Cryptococcus neoformans* PUM1. *Scientific Reports* **6**:9.
26. **Guo N, Qian Y, Zhang QQ, Chen XX, Zeng GH, Zhang X, Mi WB, Xu C, Leger RJS, Fang WG.** 2017. Alternative transcription start site selection in Mr-OPY2 controls lifestyle transitions in the fungus *Metarhizium robertsii*. *Nature Communications* **8**:13.
27. **Taggart J, MacDiarmid CW, Haws S, Eide DJ.** 2017. Zap1-dependent transcription from an alternative upstream promoter controls translation of RTC4 mRNA in zinc-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **106**:678-689.
28. **Minetoki T, Nunokawa Y, Gomi K, Kitamoto K, Kumagai C, Tamura G.** 1996. Deletion analysis of promoter elements of the *Aspergillus oryzae* *agdA* encoding alpha-glucosidase. *Current Genetics* **30**:432-438.
29. **Mizutani O, Kudo Y, Saito A, Matsuura T, Inoue H, Abe K, Gomi K.** 2008. A defect of ligD (human lig4 homolog) for nonhomologous end joining significantly improves efficiency of gene-targeting in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* **45**:878-889.
30. **Hanahan D.** 1983. STUDIES ON TRANSFORMATION OF *ESCHERICHIA-COLI* WITH PLASMIDS. *Journal of Molecular Biology* **166**:557-580.
31. **Livak KJ, Schmittgen TD.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* **25**:402-408.
32. **Inoue H, Nojima H, Okayama H.** 1990. HIGH-EFFICIENCY TRANSFORMATION OF *ESCHERICHIA-COLI* WITH PLASMIDS. *Gene* **96**:23-28.
33. **Yamada O, Lee BR, Gomi K.** 1997. Transformation system for *Aspergillus oryzae* with double auxotrophic mutations, *niaD* and *sC*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **61**:1367-1369.
34. **Gomi K, Iimura Y, Hara S.** 1987. INTEGRATIVE TRANSFORMATION OF *ASPERGILLUS-ORYZAE* WITH A PLASMID CONTAINING THE *ASPERGILLUS-NIDULANS*-*ARGB* GENE. *Agricultural and Biological Chemistry* **51**:2549-2555.
35. **Tanaka M, Tokuoka M, Shintani T, Gomi K.** 2012. Transcripts of a heterologous gene

- encoding mite allergen Der f 7 are stabilized by codon optimization in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **96**:1275-1282.
36. **Jefferson RA.** 1989. THE GUS REPORTER GENE SYSTEM. *Nature* **342**:837-838.
  37. **Bradford MM.** 1976. RAPID AND SENSITIVE METHOD FOR QUANTITATION OF MICROGRAM QUANTITIES OF PROTEIN UTILIZING PRINCIPLE OF PROTEIN-DYE BINDING. *Analytical Biochemistry* **72**:248-254.
  38. **Cerqueira GC, Arnaud MB, Inglis DO, Skrzypek MS, Binkley G, Simison M, Miyasato SR, Binkley J, Orvis J, Shah P, Wymore F, Sherlock G, Wortman JR.** 2014. The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Research* **42**:D705-D710.
  39. **Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren JY, Li WW, Noble WS.** 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research* **37**:W202-W208.
  40. **Ayoubi TAY, VanDeVen WJM.** 1996. Regulation of gene expression by alternative promoters. *Faseb Journal* **10**:453-460.
  41. **Davuluri RV, Suzuki Y, Sugano S, Plass C, Huang THM.** 2008. The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends in Genetics* **24**:167-177.
  42. **Rojas-Duran MF, Gilbert WV.** 2012. Alternative transcription start site selection leads to large differences in translation activity in yeast. *Rna-a Publication of the Rna Society* **18**:2299-2305.
  43. **Armitt S, McCullough W, Roberts CF.** 1976. ANALYSIS OF ACETATE NON-UTILIZING (ACU) MUTANTS IN *ASPERGILLUS-NIDULANS*. *Journal of General Microbiology* **92**:263-282.
  44. **Jin FJ, Han P, Zhuang M, Zhang ZM, Jin L, Koyama Y.** 2018. Comparative proteomic analysis: SclR is importantly involved in carbohydrate metabolism in *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**:319-332.
  45. **Roy SW, Penny D, Neafsey DE.** 2007. Evolutionary conservation of UTR intron boundaries in *Cryptococcus*. *Molecular Biology and Evolution* **24**:1140-1148.
  46. **Morris DR, Geballe AP.** 2000. Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Molecular and Cellular Biology* **20**:8635-8642.
  47. **Rose AB, Emami S, Bradnam K, Korf I.** 2011. Evidence for a DNA-based mechanism of intron-mediated enhancement. *Frontiers in Plant Science* **2**:9.
  48. **Goebels C, Thonn A, Gonzalez-Hilarion S, Rolland O, Moyrand F, Beilharz TH, Janbon G.** 2013. Introns Regulate Gene Expression in *Cryptococcus neoformans* in a Pab2p Dependent Pathway. *Plos Genetics* **9**:15.

49. **Bicknell AA, Cenik C, Chua HN, Roth FP, Moore MJ.** 2012. Introns in UTRs: Why we should stop ignoring them. *Bioessays* **34**:1025-1034.
50. **Agarwal N, Ansari A.** 2016. Enhancement of Transcription by a Splicing-Competent Intron Is Dependent on Promoter Directionality. *Plos Genetics* **12**:20.
51. **Hashimoto S, Suzuki Y, Kasai Y, Morohoshi K, Yamada T, Sese J, Morishita S, Sugano S, Matsushima K.** 2004. 5'-end SAGE for the analysis of transcriptional start sites. *Nature Biotechnology* **22**:1146-1149.
52. **de Vries RP, Riley R, Wiebenga A, Aguilar-Osorio G, Amillis S, Uchima CA, Anderluh G, Asadollahi M, Askin M, Barry K, Battaglia E, Bayram O, Benocci T, Braus-Stromeier SA, Caldana C, Canovas D, Cerqueira GC, Chen FS, Chen WP, Choi C, Clum A, dos Santos RAC, Damasio ARD, Dhalluin G, Emri T, Fekete E, Flippin M, Freyberg S, Gallo A, Gournas C, Habgood R, Hainaut M, Harispe ML, Henrissat B, Hilden KS, Hope R, Hossain A, Karabika E, Karaffa L, Karanyi Z, Krasevec N, Kuo A, Kusch H, LaButti K, Lagendijk EL, Lapidus A, Levasseur A, Lindquist E, Lipzen A, Logrieco AF, et al.** 2017. Comparative genomics reveals high biological diversity and specific adaptations in the industrially and medically important fungal genus *Aspergillus*. *Genome Biology* **18**:45.
53. **Andersen MR, Vongsangnak W, Panagiotou G, Salazar MP, Lehmann L, Nielsen J.** 2008. A trispecies *Aspergillus* microarray: Comparative transcriptomics of three *Aspergillus* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:4387-4392.
54. **Frith MC, Ponjavic J, Fredman D, Kai C, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Sandelin A.** 2006. Evolutionary turnover of mammalian transcription start sites. *Genome Research* **16**:713-722.
55. **Tanaka T, Koyanagi KO, Itoh T.** 2009. Highly Diversified Molecular Evolution of Downstream Transcription Start Sites in Rice and Arabidopsis. *Plant Physiology* **149**:1316-1324.
56. **Cotney J, Leng J, Yin J, Reilly SK, DeMare LE, Emera D, Ayoub AE, Rakic P, Noonan JP.** 2013. The Evolution of Lineage-Specific Regulatory Activities in the Human Embryonic Limb. *Cell* **154**:185-196.
57. **Young RS, Hayashizaki Y, Andersson R, Sandelin A, Kawaji H, Itoh M, Lassmann T, Carninci P, Bickmore WA, Forrest AR, Taylor MS, The FC.** 2015. The frequent evolutionary birth and death of functional promoters in mouse and human. *Genome Research* **25**:1546-1557.
58. **Forrest ARR, Kawaji H, Rehli M, Baillie JK, de Hoon MJL, Haberle V, Lassmann T, Kulakovskiy IV, Lizio M, Itoh M, Andersson R, Mungall CJ, Meehan TF, Schmeier S, Bertin N, Jorgensen M, Dimont E, Arner E, Schmidl C, Schaefer U, Medvedeva YA, Plessy C,**

- Vitezic M, Severin J, Semple CA, Ishizu Y, Young RS, Francescato M, Alam I, Albanese D, Altschuler GM, Arakawa T, Archer JAC, Arner P, Babina M, Rennie S, Balwiercz PJ, Beckhouse AG, Pradhan-Bhatt S, Blake JA, Blumenthal A, Bodega B, Bonetti A, Briggs J, Brombacher F, Burroughs AM, Califano A, Cannistraci CV, Carbajo D, Chen Y, et al. 2014. A promoter-level mammalian expression atlas. *Nature* **507**:462-+.
59. Roumelioti K, Vangelatos I, Sophianopoulou V. 2010. A cryptic role of a glycolytic-gluconeogenic enzyme (aldolase) in amino acid transporter turnover in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genetics and Biology* **47**:254-267.
  60. Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglu S, Lee SI, Basturkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Scacciocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Penalva MA, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA, Birren BW. 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**:1105-1115.
  61. Takahashi T, Mizutani O, Shiraishi Y, Yamada O. 2011. Development of an efficient gene-targeting system in *Aspergillus luchuensis* by deletion of the non-homologous end joining system. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **112**:529-534.
  62. Raper KB. 1946. THE DEVELOPMENT OF IMPROVED PENICILLIN-PRODUCING MOLDS. *Annals of the New York Academy of Sciences* **48**:41-&.
  63. Murata M, Nishiyori-Sueki H, Kojima-Ishiyama M, Carninci P, Hayashizaki Y, Itoh M. 2014. Detecting Expressed Genes Using CAGE, p 67-85. *In* Miyamoto-Sato E, Ohashi H, Sasaki H, Nishikawa J-i, Yanagawa H (ed), *Transcription Factor Regulatory Networks: Methods and Protocols* doi:10.1007/978-1-4939-0805-9\_7. Springer New York, New York, NY.
  64. Ohmiya H, Vitezic M, Frith MC, Itoh M, Carninci P, Forrest ARR, Hayashizaki Y, Lassmann T, Consortium F. 2014. RECLU: a pipeline to discover reproducible transcriptional start sites and their alternative regulation using capped analysis of gene expression (CAGE). *Bmc Genomics* **15**:15.
  65. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. 2011. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* **29**:24-26.
  66. Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J, Semple CAM, Taylor MS, Engstrom PG, Frith MC, Forrest ARR, Alkema WB, Tan SL, Plessy C, Kodzius R, Ravasi T, Kasukawa T, Fukuda S, Kanamori-Katayama M, Kitazume Y, Kawaji H, Kai C, Nakamura M, Konno H, Nakano K, Mottagui-Tabar S, Arner P, Chesi A, Gustincich S, Persichetti F, Suzuki H, Grimmond SM, Wells CA, Orlando V, Wahlestedt C, Liu ET,

- Harbers M, Kawai J, Bajic VB, Hume DA, Hayashizaki Y.** 2006. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nature Genetics* **38**:626-635.
67. **Li H, Hou JY, Bai L, Hu CS, Tong P, Kang YN, Zhao XD, Shao ZF.** 2015. Genome-wide analysis of core promoter structures in *Schizosaccharomyces pombe* with DeepCAGE. *Rna Biology* **12**:525-537.
68. **Sibthorp C, Wu HH, Cowley G, Wong PWH, Palaima P, Morozov IY, Weedall GD, Caddick MX.** 2013. Transcriptome analysis of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* directed to the global identification of promoters. *Bmc Genomics* **14**:18.
69. **Johnson AD.** 2017. The rewiring of transcription circuits in evolution. *Current Opinion in Genetics & Development* **47**:121-127.
70. **Okar DA, Lange AJ.** 1999. Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *Biofactors* **10**:1-14.
71. **Wakai S, Yoshie T, Asai-Nakashima N, Yamada R, Ogino C, Tsutsumi H, Hata Y, Kondo A.** 2014. L-lactic acid production from starch by simultaneous saccharification and fermentation in a genetically engineered *Aspergillus oryzae* pure culture. *Bioresource Technology* **173**:376-383.

#### 原著論文

**Taishi Inoue, Hiroki Toji, Mizuki Tanaka, Mitsuru Takama, Sachiko Hasegawa-Shiro, Yuichi Yamaki, Takahiro Shintani and Katsuya Gomi** (2020) Alternative transcription start sites of the enolase-encoding gene *enoA* are stringently used in glycolytic/gluconeogenic conditions in *Aspergillus oryzae*. *Current Genetics*, DOI: 10.1007/s00294-020-01053-3, in press

## 謝辞

本博士論文作成にあたり、終始御指導と御高配を賜りました、東北大学大学院農学研究科 発酵微生物学講座教授 五味勝也 博士および東北大学大学院農学研究科 遺伝子情報システム学分野准教授 新谷尚弘 博士に謹んで感謝申し上げます。また、日頃より御指導、ご鞭撻頂きました東北大学大学院農学研究科 遺伝子情報システム学分野助教 渡部昭 博士、静岡県立大学食品栄養科学部助教 田中瑞己 博士、東北大学大学院農学研究科 発酵微生物学講座特任助教 藤田翔貴 博士に厚く御礼申し上げます。

本博士論文の副査を引き受けていただきました、東北大学大学院農学研究科 応用微生物学分野教授 阿部敬悦 博士、東北大学大学院農学研究科 動物微生物学分野教授 米山裕 博士、東北大学大学院農学研究科 発酵微生物学講座教授 五味勝也 博士に謹んで感謝申し上げます。

本博士論文の研究は、東北大学学際高等研究教育院の支援により行われました。この場を借りて謹んで感謝申し上げます。

本博士論文の CAGE 解析は株式会社ダナフォーム様にご協力頂きました。この場を借りて謹んで感謝申し上げます。

本博士論文の CAGE データ解析にあたり、ご指導いただきました東北大学大学院農学研究科 海洋生命遺伝情報システム学分野准教授 酒井義文 博士に謹んで感謝申し上げます。

日頃より多岐に渡りご助言を賜り、よき相談相手となってくださいました、遺伝子情報システム学研究室の諸先輩の方々、同期の方々、後輩の方々に感謝申し上げます。

最後に、あらゆる面で支えとなり、常に温かく見守ってくれた家族に、厚く御礼申し上げます。